

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



Mgr Łukasz Skalski

Ekspresja enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV

The expression of drugs metabolising enzymes in patients with HCV

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Mateusz Kurzawski

Szczecin, 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Ja niżej podpisany/a Łukasz Skalski, doktorant Wydziału Medycyny i Stomatologii, studiów doktoranckich Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie:

1. **OŚWIADCZAM**, że przedkładana praca dyplomowa pt.: „Ekspresja enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV”. – została wykonana samodzielnie. Oznacza to, że przy pisaniu pracy, poza niezbędnymi konsultacjami z opiekunem, nie korzystałem z pomocy innych osób, a w szczególności nie zlecałem opracowania rozprawy lub jej części innym osobom, ani nie odpisywałem tej pracy lub jej części ze źródeł nieumieszczonych w wykazie piśmiennictwa.

Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.

W załączeniu przedstawiam oryginał pracy na nośniku pamięci elektronicznej w edytorze tekstu Microsoft Word 97-2003.

.....

(czytelny podpis doktoranta)

2. zgodę/y na udostępnienie mojej w/w pracy.

(wyrażam/ nie wyrażam)

Szczecin, dnia

.....

(czytelny podpis doktoranta)

*Chciałbym serdecznie podziękować mojemu promotorowi, prof. dr hab. n. med. **Mateuszowi Kurzawskiemu**, za wsparcie, inspirację i cenne wskazówki, które umożliwiły mi osiągnięcie celu. Jego zaangażowanie i opieka były dla mnie nieocenione.*

*Chciałbym również wyrazić wdzięczność dla dr n. med. **Magdaleny Budziałowskiej**, dr n. med. **Joanny Łapczuk-Romańskiej** oraz dr n. med. **Damiana Malinowskiego** za ich wsparcie, naukę i cenne uwagi. Ich komentarze i wskazówki były niezwykle cenne i pomogły mi doskonalić moje badania.*

*Nie mogę zapomnieć o mojej **rodzinie i przyjaciółach**, którzy zawsze byli ze mną w trudnych chwilach i zawsze służyli mi radą i pomocą. Ich wsparcie i motywacja były dla mnie niezwykle ważne.*

*Chciałbym również serdecznie podziękować kierownikowi Katedry Farmakologii, prof. dr hab. n. med. **Markowi Drożdżikowi**, za umożliwienie mi odbywania doktoratu. Bez jego zaangażowania i wsparcia nie miałbym możliwości realizacji moich badań. Serdecznie dziękuję również **wszystkim pracownikom Katedry Farmakologii** za życzliwość i uśmiech.*

*Na koniec chciałbym podziękować **moim nauczycielom**, którzy zapewнили mi wykształcenie i umiejętności, które umożliwiły mi realizację tej rozprawy doktorskiej. Ich wiedza i doświadczenie były dla mnie bezcenne*

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP.....	8
1.1.WĄTROBA W METABOLIZMIE LEKÓW	9
1.2.FARMAKOTERAPIA WZW TYPU C.....	37
2. CEL PRACY.....	51
3.MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	52
3.1.Material:.....	52
3.2.Izolacja mRNA oraz ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time RT-PCR):.....	53
3.3.Analiza ilościowa białka z zastosowaniem LC–MC/MS	57
3.3.1.Procedura FASP	58
3.4.Genotypowanie	62
3.5. Obliczenia statystyczne	63
4.KORZYŚCI BADAŃ	64
5.WYNIKI I OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ.....	65
5.1.Ilościowe określenie zawartości RNA i białek wybranych enzymów CYP450 i UGT.....	65
5.2.Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka	82
5.3. Analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków oceniona na poziomie mRNA i białka	96
6.DYSKUSJA.....	101
7.WNIOSKI	113
8.STRESZCZENIE	114
9.SUMMARY.....	116
10.PIŚMIENNICTWO.....	118
11.SPIS RYCIN	133
12.SPIS TABEL.....	139
13.ZAŁĄCZNIKI.....	140

WYKAZ SKRÓTÓW

ABC	<i>ang. ATP-binding cassette, rodzina białek ABC</i>
AHR	<i>ang. aryl hydrocarbon receptor, receptor węglowodorów aromatycznych</i>
AIH	<i>ang. autoimmune hepatitis, autoimmunologiczne zapalenie wątroby</i>
ALP	<i>ang. alkaline phosphatase, fosfataza alkaliczna</i>
ALT	<i>ang. alanine transaminase, aminotransferaza alaninowa</i>
AST	<i>ang. aspartate transaminase, aminotransferaza asparaginianowa</i>
ATP	<i>ang. adenosine triphosphate, adenozyno-5'-trifosforan</i>
AUC	<i>ang. area under the curve, pole pod krzywą</i>
BCRP	<i>ang. breast cancer resistance protein, białko oporności raka piersi</i>
CAR	<i>ang. constitutive androstane receptor, konstytutywny receptor dla androstanu</i>
CMV	<i>ang. cytomegalovirus, wirus cytomegalii</i>
CNV	<i>ang. Copy Number Variation, zmienna liczba kopii genu</i>
DAA	<i>ang. direct-acting antivirals, leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym</i>
EASL	<i>ang. European Association for the Study of the Liver, Europejskie Stowarzyszenie Badań nad Wątrobą</i>
EBV	<i>ang. Epstein–Barr virus, wirus Epstein-Barr’a</i>
ECHO	<i>ang. enteric cytopathogenic human orphan viruses, ECHO wirusy</i>
EDTA	<i>ang. ethylenediaminetetraacetic acid, kwas wersenowy</i>
EM	<i>ang. extensive metabolizers, szybcy metabolizerzy</i>
EMA	<i>ang. European Medicines Agency, Europejska Agencja Leków</i>
FDA	<i>ang. Food and Drug Administration, Agencja Żywności i Leków</i>
GGTP	gamma-glutamylotranspeptydazy
HBV	<i>ang. hepatitis B virus, wirus zapalenia wątroby typu B</i>

HCV	<i>ang. hepatitis C virus</i> , wirus zapalenia wątroby typu C
HIV	<i>ang. human immunodeficiency virus</i> , ludzki wirus niedoboru odporności
HNF	<i>ang. hepatocyte nuclear factor</i> , jądrowy czynnik hepatocytów
HNFs	<i>ang. hepatocyte nuclear factors</i> , czynniki jądrowe hepatocytów
HSV-1	<i>ang. herpes simplex virus 1</i> , wirus opryszczki pospolitej typu 1
HSV-2	<i>ang. herpes simplex virus 2</i> , wirus opryszczki pospolitej typu 2
HTA	<i>ang. host targeting agents</i> , leki antywirusowe działające na czynniki komórkowe
IFN-γ	interferon-gamma
IL-1	interleukina-1
IL-18	interleukina-18
IL-1α	interleukina-1 alfa
IL-1β	interleukina-1 beta
IL-28	interleukina-28
IL-6	interleukina-6
IM	<i>ang. intermediate metabolizers</i> , pośredni metabolizerzy
IRES	<i>ang. internal ribosomal entry site</i> , wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
NF-κB	czynnik jądrowy kappa B
PBC	<i>ang. primary biliary cholangitis</i> , pierwotne zapalenie dróg żółciowych
PBPK	<i>ang. physiologically based pharmacokinetic</i> , model farmakodynamiczny
PegINFα	pegylowany interferon alfa
P-gp	glikoproteina P
PM	<i>ang. poor metabolizers</i> , wolni metabolizerzy
PSC	<i>ang. primary sclerosing cholangitis</i> , pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych
PXR	<i>ang. pregnane X receptor</i> , receptor X pregnanu

RBV	rybawiryna
RXR	<i>ang. retinoid X receptor</i> , receptor X retinoidów
SDS	sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego
SLC	<i>ang. solute carrier</i> , transportery z rodziny SLC
SNP	<i>ang. Single Nucleotide Polimorphism</i> , polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SVR	<i>ang. sustained virologic response</i> , trwała odpowiedź wirusologiczna
SXR	<i>ang. steroid xenobiotic receptor</i> , receptor ksenobiotyków sterydowych
TNF-α	<i>ang. tumor necrosis factor</i> , czynnik martwicy nowotworów-alfa
UM	<i>ang. ultrarapid metabolizers</i> , ultraszybcy metabolizerzy,

1. WSTĘP

Komórki wątroby pełnią istotną rolę w metabolizmie różnych substancji dostarczanych do organizmu. W przypadku zaburzeń związanych z wystąpieniem różnego rodzaju patologii wątroby, ograniczających jej prawidłowe działanie (takich, jak np. wirusowe zapalenie wątroby) może dojść do sytuacji, w której przebieg biotransformacji będzie znacząco zmieniony, ponieważ narząd ten jest głównym organem biorącym udział w procesach metabolizmu związków endo- i egzogennych (w tym detoksykacji), a co za tym idzie również substancji stosowanych jako leki. W wątrobie, głównymi enzymami zaangażowanymi w procesy metabolizmu leków i innych ksenobiotyków są białka cytochromu P450, katalizujące reakcje I fazy, a także liczne enzymy katalizujące reakcje sprzęgania (tzw. II fazy) [1,2].

Aktywność enzymów biorących udział w metabolizmie leków jest zależna od wielu czynników, które warunkują wydajność poszczególnych etapów biotransformacji leków (na przykład czynników fizjologicznych, genetycznych czy patologicznych). Dane dotyczące zmian w zawartości poszczególnych enzymów w stanach patologicznych wątroby, a w szczególności w schorzeniach o podłożu wirusowym, takich jak HCV (z ang. *Hepatitis C virus*, *wirusowe zapalenie wątroby typu C*), są jednak niepełne, a jeszcze mniej wiadomo na temat mechanizmów regulacyjnych, które leżą u podstaw tych zmian. Badania wskazują, że ekspresja niektórych enzymów jest częściowo regulowana przez tzw. receptory jądrowe na poziomie transkrypcji. Wskazuje na to, między innymi, korelacja ekspresji genów enzymów metabolizujących leki na poziomie mRNA z ilością powstającego białka, także w stanach patologicznych. Możliwy jest również udział innych mechanizmów regulacyjnych, w tym epigenetycznych (miRNA, metylacja DNA, S-nitrozylacja białek). Dostępne w literaturze ilościowe opisy mRNA oraz prace dotyczące badania poziomu ekspresji enzymów metabolizujących leki dotyczą głównie zdrowych tkanek i nie zawsze są one skorelowane z ilościową zawartością białka. Tak więc, istotne jest określenie ekspresji genów enzymów metabolizujących leki oraz ich ilościowe oznaczenie na poziomie białka przy użyciu wiarygodnych metod laboratoryjnych (np. LC-MS/MS - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas) w stanach patologicznych wątroby, takich, jak na przykład HCV [3-5].

Poszerzenie wiedzy na temat zawartości (a pośrednio aktywności) poszczególnych enzymów w chorobach infekcyjnych wątroby doprowadzi do lepszego zrozumienia procesów kinetyki leków, a w przyszłości może być przydatne w procesie tworzenia nowych leków

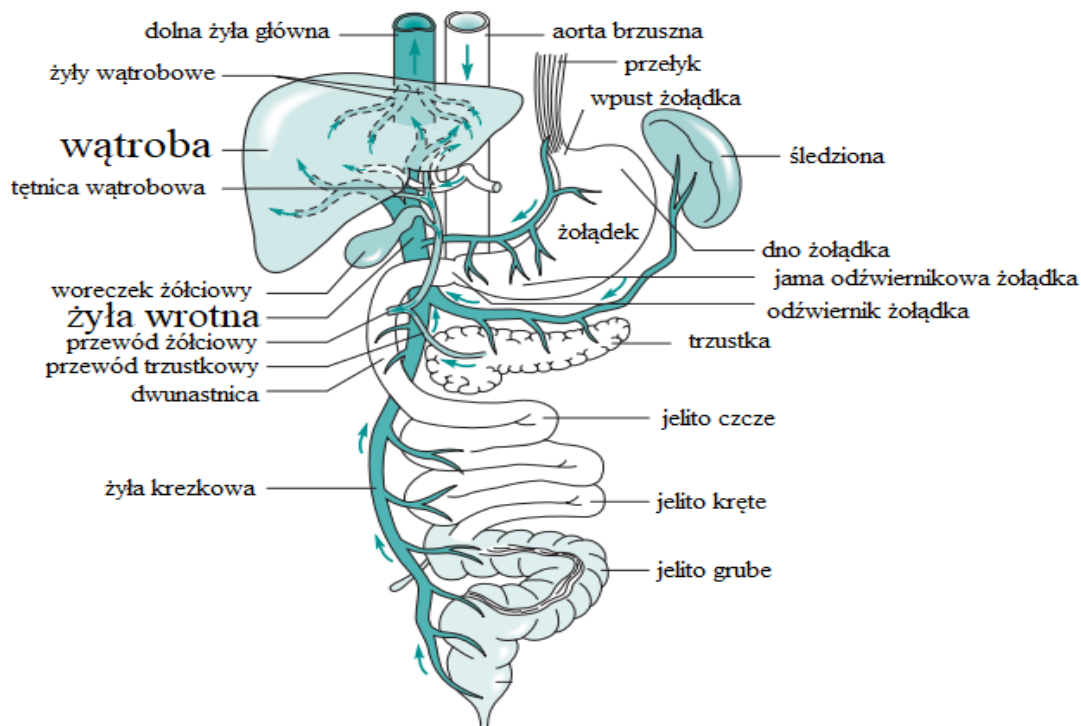
lub modyfikacji schematów dawkowania już istniejących. Wiedza ta będzie użyteczna także w wyjaśnianiu toksyczności oraz interakcji leków w danej populacji chorych (poszerzenie wiedzy na temat zwiększonego ryzyka występowania interakcji lub jego obniżenia). Ocena zmian w ekspresji genów systemu detoksykacyjnego pod wpływem różnych czynników uczestniczących w patogenezie chorób infekcyjnych wątroby może stanowić istotną wartość w ocenie skuteczności terapii, bądź może być cennym źródłem informacji na temat patogenezy danego schorzenia [3-5]. W ostatnich latach pojawiło się także dużo doniesień dotyczących wpływu występowania stanu zapalnego na wątrobowy metabolizm leków, chociażby przez zwiększoną w takich stanach produkcję cytokin [6]. Wyniki uzyskane z analizy prób wątroby pacjentów z HCV mogą więc także dać pewien obraz zmian w metabolizmie leków w innych grupach pacjentów z niewydolnością wątroby o podłożu zapalnym.

1.1. WĄTROBA W METABOLIZMIE LEKÓW

W organizmie człowieka, wątroba jest największym gruczołem, który pełni bardzo różnorodne funkcje. Oprócz udziału w przemianach lipidów, węglowodanów i białek, wytwarzaniu żółci, metabolizmie hemu, syntezie czynników krzepnięcia i funkcji immunologicznych, jest najważniejszym narządem w procesie detoksykacji oraz metabolizmie ksenobiotyków, w tym leków. Badania kliniczne wskazują, że w przebiegu chorób wątroby metabolizm leków jest zmieniony, co związane jest, między innymi, ze zmienioną aktywnością enzymatyczną oraz zaburzonym transportem substancji do wnętrza hepatocytów. Konsekwencją chorób wątroby jest więc zmieniona farmakokinetyka wielu leków, co może mieć wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo leczenia farmakologicznego. Podłoże chorób wątroby, prowadzących do ciężkiej niewydolności tego narządu jest jednak różnorodne i obejmuje zarówno czynniki infekcyjne np. HCV (*ang. hepatitis C virus*, wirus zapalenia wątroby typu C), HBV (*ang. hepatitis B virus*, wirus zapalenia wątroby typu B), reakcje autoimmunologiczne np. PBC (*ang. primary biliary cholangitis*, pierwotne zapalenie dróg żółciowych), PSC (*ang. primary sclerosing cholangitis*, pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych), AIH (*ang. autoimmune hepatitis*, autoimmunologiczne zapalenie wątroby), czy uszkodzenie toksyczne (np. alkoholowa choroba wątroby). Wirusowe czynniki zakaźne, takie jak HCV, są związane ze zwiększoną śmiertelnością wśród pacjentów, głównie

w konsekwencji powodowania poważnych dysfunkcji w pracy tego narządu. Zakażenie HCV wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia marskości wątroby oraz nowotworzeniem [7, 8].

Wątroba to organ mięsisty, odpowiadający za metabolizm bardzo szerokiej grupy substancji. Odnosząc się do bardzo różnorodnych funkcji jakie pełni ten narząd, wątroba jest organem o uniwersalnych właściwościach, zarówno w stanie zdrowia, jak i chorób toczących się w jej obrębie oraz poza jej obszarem. Ze względu na rolę w przemianach lipidów, węglowodanów i białek, organ ten charakteryzuje się dużym zapotrzebowaniem na tlen oraz substancje odżywcze, dlatego też wątroba jest narządem bardzo mocno ukrwionym. W wątrobie można wyróżnić dwa główne rodzaje: ukrwienie czynnościowe oraz ukrwienie odżywcze (rysunek 1). Podstawowe natlenienie narządu zapewnia tętnica wątrobowa. Żyłą wrotną zaś transportowane są, przede wszystkim, związki wchłaniane w przewodzie pokarmowym, w tym substancje odżywcze, a także leki. Ten rodzaj zależności, a zwłaszcza lokalizacja i rodzaj unaczynienia ma duże znaczenie jeśli chodzi o pełnione przez wątrobę funkcje, w tym te związane z metabolizmem leków, w pierwszej kolejności tych podawanych drogą doustną, które trafiają do wątroby krążeniem wrotnym, zanim ulegną dystrybucji do docelowych tkanek i narządów. Wielkość i unaczynienie wątroby oraz ekspresja genów enzymów metabolizujących leki są przyczyną największego udziału tego narządu w biotransformacji ksenobiotyków. Dostępne dane wskazują, że blisko 75% wszystkich enzymów metabolizujących leki w organizmie jest zlokalizowanych w wątrobie. Oprócz tkanki wątrobowej, enzymy związane z metabolizmem leków mogą być także zlokalizowane w obrębie tkanek: układu pokarmowego - jelit, układu wydalniczego - nerek, układu oddechowego - płuc, układu sercowo-naczyniowego, a także układu nerwowego – mózgu [8, 9, 10].



Rysunek 1. Unaczynienie wątroby. Na podstawie: [11], zmodyfikowano.

W strukturze wątroby można zaobserwować efektywne przystosowanie czynnościowe do pełnienia funkcji metabolicznych, w budowie histologicznej wątroby obserwuje się znaczną przewagę (około 80% wszystkich komórek tego narządu) wyspecjalizowanych komórek - hepatocytów, których wnętrza stanowią "bank" enzymów metabolizujących leki, natomiast pozostałą część stanowią komórki: siateczkowo-śródbłonkowe, gwiaździste, Browicza-Kupfera oraz komórki tkanki łącznej, dróg żółciowych i naczyń krwionośnych [8]. Wirusowe czynniki zakaźne, takie jak HCV, są związane ze zwiększoną śmiertelnością wśród pacjentów, poprzez powodowanie poważnych dysfunkcji w pracy tego narządu. W trakcie rozwoju marskości wątroby dochodzi do zaburzenia jej fizjologicznych funkcji oraz jej uszkodzenia. W wyniku długotrwałego stanu zapalnego, występującego w wątrobie, obserwuje się spadek liczby zdrowych komórek hepatocytarnych oraz gromadzenie się tkanki włóknistej w mięszu wątrobowym, która jest formą tworzenia blizn pozapalnych. Z czasem, gdy stan zapalny w wątrobie nie jest leczony, proces bliznowacenia nasila się, a na skutek pojawienia się zbliznowaceń, przy coraz większym udziale ilościowym tkanki włóknistej (na przykład w postaci guzków regeneracyjnych), funkcje wątroby są coraz bardziej ograniczone. Ze względu na powstające zwłóknienia, w mięszu wątrobowym powstają ostatecznie przegrody (septy), blokujące prawidłowy przepływ krwi, hamując tym samym

dopływ składników odżywczych oraz ksenobiotyków do komórek docelowych, istotnie zmieniając także wydajność biotransformacji [7-10].

W cytoplazmie hepatocytów zlokalizowane są enzymy, które w przypadku uszkodzenia błon komórkowych wydostają się do krwiobiegu, powodując wzrost ich stężenia i aktywności we krwi – są to, między innymi, ALT (aminotransferaza alaninowa) i AST (aminotransferaza asparaginianowa). Są one cennym, diagnostycznym źródłem informacji o stanie zdrowia tego narządu. Zmieniony, wysoki poziom aktywności ALT i AST może świadczyć o uszkodzeniu komórek wątroby w ostrych i przewlekłych chorobach tego organu, takich jak HBV, HCV, toksyczne uszkodzenie wątroby czy marskość wątroby. Dodatkowo, w diagnostyce, bada się aktywność enzymów związanych z nabłonkiem dróg żółciowych: ALP (fosfataza zasadowa) i GGTP (gamma-glutamylotranspeptydaza). Wzrost ich aktywności jest istotny w diagnostyce niedrożności dróg żółciowych, cholestazy wątrobowej spowodowanej kamicią żółciową, a także w przypadku diagnostyki onkologicznej [7, 8].

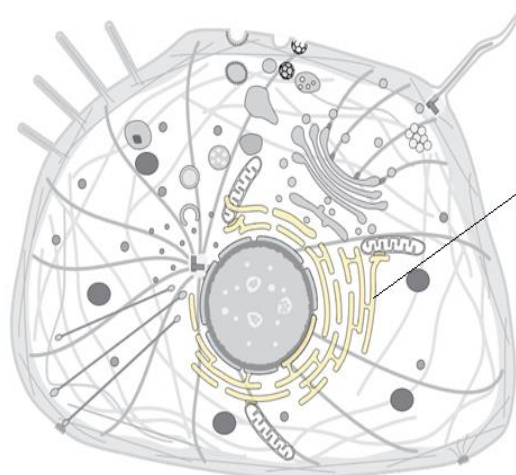
W rozpoznaniu HCV, oprócz powyższych wskaźników laboratoryjnych, pomocne są badania serologiczne oraz wirusologiczne. Służą one diagnostyce różnicowej, która umożliwia diagnozę HCV: od 1-3 tygodni od zakażenia (jeśli badany jest RNA HCV) i 4-10 tygodni od zakażenia (w przypadku badań wykrywania przeciwciał anti-HCV). RNA HCV - występuje we krwi okresowo, dlatego na podstawie pojedynczego, ujemnego wyniku badania nie można wykluczyć w 100% zakażenia HCV u chorego na zapalenie wątroby. Taki test należy powtórzyć. Dodatkowo, pomocniczą metodą w diagnostyce jest oznaczenie we krwi antygenu rdzeniowego HCV (HCVcAg) [8].

W miarę poszerzania dostępnej wiedzy w zakresie nauki o lekach, coraz większą wagę przykłada się do zagadnień związanych ze szczególnymi funkcjami pełnionymi przez tkanki i komórki, szczególnie te, które tworzą wątrobę i związane są z procesami odpowiadającymi za los leków w organizmie, ich metabolizm - biotransformację. Na aktywne, sekwencyjne procesy biotransformacji leków, składają się liczne reakcje metaboliczne, warunkujące zarówno biodostępność leków, jak i ich interakcje, wykorzystujące zasób enzymów przekształcających wiele substancji endo- i egzogennych. Enzymy te znajdują się przede wszystkim w obrębie gładkiego retikulum endoplazmatycznego, wchodząc w skład układu mikrosomalnego zlokalizowanego w obrębie komórek hepatocytarnych, gdzie występują w przeważającej ilości. Ze względu na bardzo szeroki zakres działania, a w szczególności mnogość funkcji w zakresie biosyntezy związków endogennych oraz przemiany związków

endo- i egzogennych, hepatocyty są szczególnie bogate w organella i struktury komórkowe, takie jak: mitochondria, lizosomy, peroksosomy. Rozbudowany system retikulum endoplazmatycznego (przemiana białek) oraz aparatu Golgiego (przemiana glikoproteidów, lipoproteidów oraz kwasów tłuszczowych), ze względu na występowanie zwiększonych ilości pęcherzyków i błon, oddzielających środowiska przebiegu reakcji biochemicznych, tworzy wyspecjalizowany układ, zapewniający warunki do prawidłowego procedowania przemian metabolicznych. W retikulum endoplazmatycznym szorstkim, którego błony układają się w kształt równoległych spłaszczonych cystern, zachodzą głównie reakcje związane z przemianą białek - tworzone są na przykład białka osocza. Natomiast w gładkim retikulum endoplazmatycznym (rysunek 2), znajdują się przestrzenie, w których syntezowany jest cholesterol oraz glikogen i co istotne z farmakologicznego punktu widzenia, zachodzi tu również proces detoksykacji i biotransformacji substancji toksycznych, hormonów steroidowych i leków [7, 12-15].

Hepatocyty stanowią podstawową jednostkę funkcjonalną wątroby. Mają one wielokątny kształt, a ich wielkość wynosi około 25 μm . Każda komórka hepatocytarna, pod względem funkcjonalnym posiada dwa bieguny: biegun naczyniowy oraz biegun żółciowy. Bieguny te są wyraźnie widoczne w komórce, co zapewnia oddzielenie układu krwionośnego od dróg żółciowych, a wynika to także z ułożenia hepatocytów w blaszce wątrobowej [12].

Do ściany naczyń krwionośnych (naczyń zatokowych), skierowany jest biegun naczyniowy hepatocytu, który pokryty jest licznymi, krótkimi mikrokosmkami, zwróconymi do przestrzeni Dissego (przestrzeni okołozatokowej), gdzie dochodzi do wchłaniania składników odżywczych do wnętrza komórki oraz wydzielania białek i lipidów do naczynia krwionośnego. Natomiast około 30% powierzchni hepatocytu przypada na biegun żółciowy, który stanowi powierzchnię, którą stykają się ze sobą dwa hepatocyty. Sąsiadujące ze sobą hepatocyty, w wyniku wpuklenia się błon komórkowych oraz występujących kompleksów połączeń międzykomórkowych, tworzą światło kanalika żółciowego, które jest dobrze odizolowane od pozostałej powierzchni komórek. Funkcją bieguna żółciowego jest wydzielanie żółci oraz substancji wraz z nią eliminowanych, w tym także niektórych leków [12, 13, 14, 16].



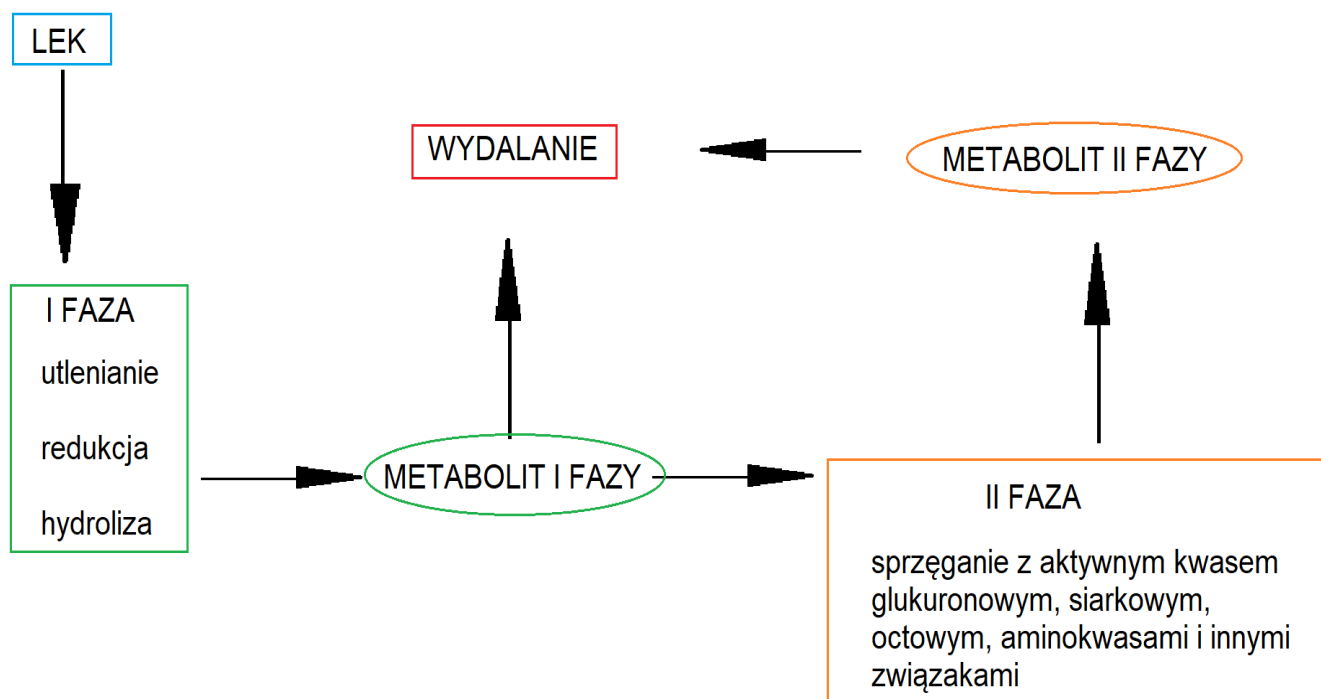
GŁADKIE RETIKULUM ENDOPLAZMATYCZNE

Rysunek 2. Gładkie retikulum endoplazmatyczne, w obrębie którego znajduje się układ mikrosomalny, bogaty w enzymy cytochromu P450. *Za:[13].*

Procesy metaboliczne, zachodzące w wątrobie (rysunek 3), obejmują szereg reakcji, które zazwyczaj zwiększają biodostępność i warunkują biodystrybucję leków poprzez przemianę dostarczanych substancji lipofilnych w substancje hydrofilowe – czyli rozpuszczalne w wodzie, możliwe do usunięcia z ustroju, w sposób bezpieczny dla organizmu. Przykładem takich procesów są reakcje: utleniania, redukcji oraz hydrolizy, które zachodzą w przeważającej mierze, z udziałem izoenzymów cytochromu P450 i są określane jako reakcje I fazy metabolizmu leków. Reakcje I fazy prowadzą przeważnie do dezaktywacji leków i utraty ich biologicznej aktywności. Natomiast niektóre związki (proleki) dopiero po przejściu przez I fazę biotransformacji są aktywowane i zdolne do wywołania efektu terapeutycznego. Zmiany w aktywności poszczególnych enzymów układu CYP450 mogą mieć zatem odmienny efekt w odniesieniu do różnych farmaceutyków. Reakcje katalizowane przez te enzymy można szczegółowo podzielić na procesy: hydroksylacji, dealkilacji, monooksygenacji, a także epoksydacji. Rodzaj substratu metabolizowanego przez enzymy cytochromu P450 warunkuje również występowanie innych reakcji: dehydratacji, dehalogenacji, dehydrogenacji, redukcji, izomeryzacji i dimeryzacji, zachodzących z wykorzystaniem aktywności monooksygenaz charakterystycznej dla nadrodziny białek hemowych [2, 14, 15, 16].

Na drugą fazę metabolizmu leków składają się natomiast różnego rodzaju reakcje, w których metabolity pochodzące z pierwszej fazy są sprzęgane z różnorodnymi substancjami endogennymi, np. kwasem siarkowym, glukuronowym czy octowym. Skutkuje to powstawaniem produktów łatwo rozpuszczalnych w wodzie oraz umożliwia ich bezpieczną

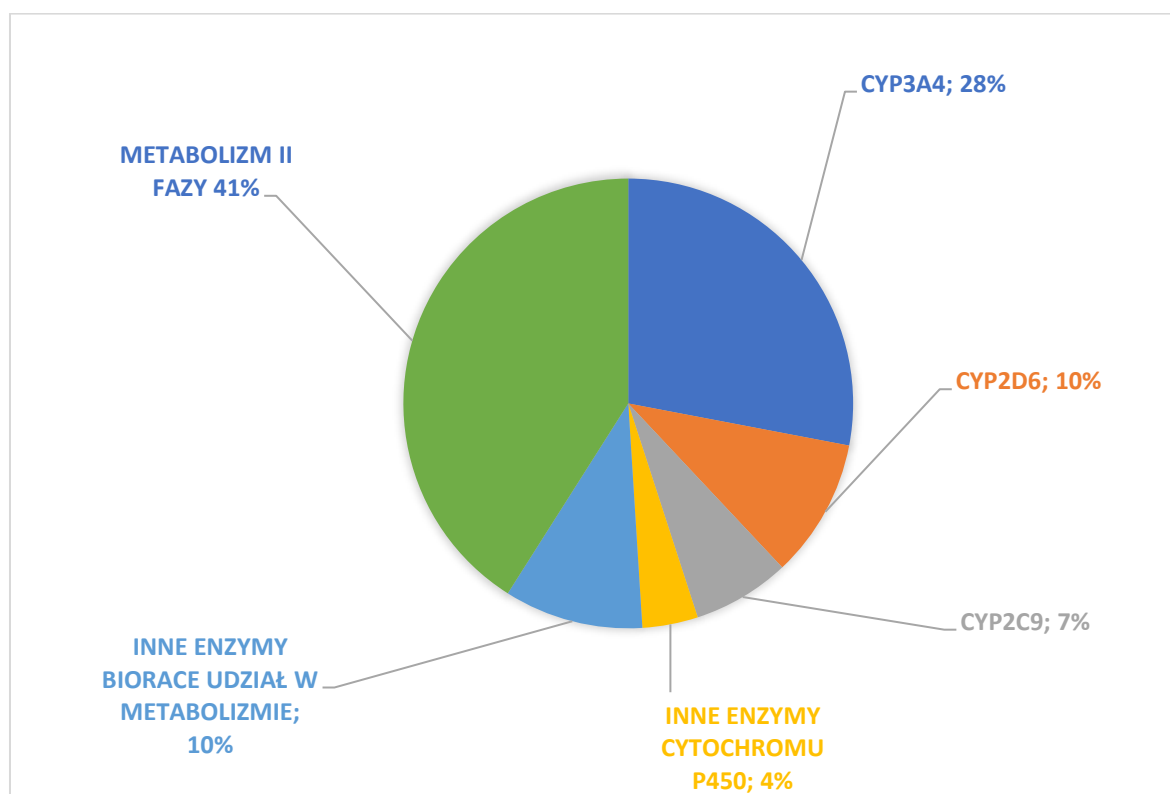
eliminację z ustroju, co można opisać jako końcowy etap, w którym następuje koniugacja szkodliwych metabolitów i ich inaktywacja w reakcjach katalizowanych głównie przez enzymy podrodziny UGT1A i 2B, a następnie ich wydalenie (drogą nerkową lub z żółcią) z organizmu. Losy poszczególnych leków w organizmie różnią się między sobą, część z nich podlega tylko jednej z opisanych faz metabolizmu, a niektóre substancje są wydalane w stanie niezmienionym [17, 18].



Rysunek 3. Ogólny schemat biotransformacji leków. *Opracowanie własne.*

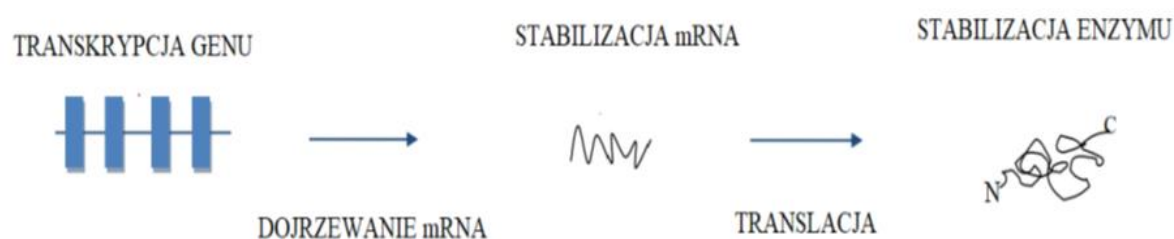
Enzymy biorące udział w biotransformacji, należące do układu cytochromu P450, stanowią nadrodzinę białek hemowych wykorzystujących właściwości monooksygenaz. W organizmie człowieka zidentyfikowano do tej pory blisko 60 izoenzymów CYP, które należą do 18 rodzin [15]. Spośród nich tylko stosunkowo niewielka liczba bierze udział w metabolizmie leków [16,17]. Większość enzymów, które są zaangażowane w procesy biotransformacji leków, należy do podrodzin: CYP1, CYP2, CYP3, które łącznie odpowiadają za metabolizm około 90% wszystkich znanych leków. Do najważniejszych enzymów wpływających na losy leków w organizmie należą: CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 (rysunek 4) [18]. Oprócz procesu biotransformacji, enzymy te biorą także udział w metabolizmie innych substratów, m.in.: steroli, kwasów tłuszczowych, witamin, czy też eikozanoidów. Dostępne dane

literaturowe wskazują, że w przypadku występowania zaburzeń funkcji wątroby, farmakokinetyka leków jest zmieniona, na przykład w konsekwencji zwiększonej biodostępności przyjmowanych doustnie leków. Modelowymi przykładami leków i substancji, których działanie jest zależne od aktywności poszczególnych enzymów układu CYP450 są: kofeina, która jest substratem dla CYP1A2, mefentoina, która jest substratem dla CYP2C19, czy debryzochina, będąca substratem dla CYP2D6. Obniżona aktywność większości enzymów CYP450 w patologich wątroby jest szczególnie istotna w procesie doboru odpowiedniej terapii farmakologicznej. Ostatnie doniesienia z przeprowadzonych badań klinicznych sugerują, że u większości (80%) pacjentów u których występują niepożądane działania leków w przebiegu występowania stłuszczenia wątroby – można by uniknąć tych zdarzeń odpowiednio modyfikując dawkę leku [19]. W związku z tymi doniesieniami, FDA (*ang. Food and Drug Administration*, Agencja Żywności i Leków) oraz EMA (*ang. European Medicines Agency*, Europejska Agencja Leków) niedawno wdrożyły rekomendacje dotyczące przeprowadzenia badań farmakokinetycznych dla pacjentów z zaburzeniami funkcji wątroby przed rozpoczęciem leczenia farmakologicznego [20, 21].



Rysunek 4. Udział poszczególnych elementów układu detoksykacyjnego w procesach metabolicznych leków. Za: [19].

Aktywność enzymów układu CYP450 jest zależna od wielu czynników, m.in. takich jak stres, wspomniane wcześniej stany patologiczne wątroby, występowanie stanu zapalnego i infekcji. Ekspresja izoform CYP450 różni się także w zależności od wielu czynników endogennych (wiek, płeć, rasa) i podlega regulacji poprzez czynniki środowiskowe (np. dieta, palenie papierosów), a w przypadku wielu izoenzymów jest także uwarunkowana genetycznie. W trakcie procesu powstawania białka, wpływ na jego ekspresję może mieć wiele czynników, w kolejno występujących po sobie etapach (rysunek 5). Czynniki te mogą modyfikować różne etapy, w przebiegu których zmiane może istotnie ulec: proces transkrypcji określonych genów, tempo degradacji specyficznych mRNA, wydajność translacji, czy też stabilność powstałego białka.



Rysunek 5. Etapy ekspresji genów CYP450. Za:[24].

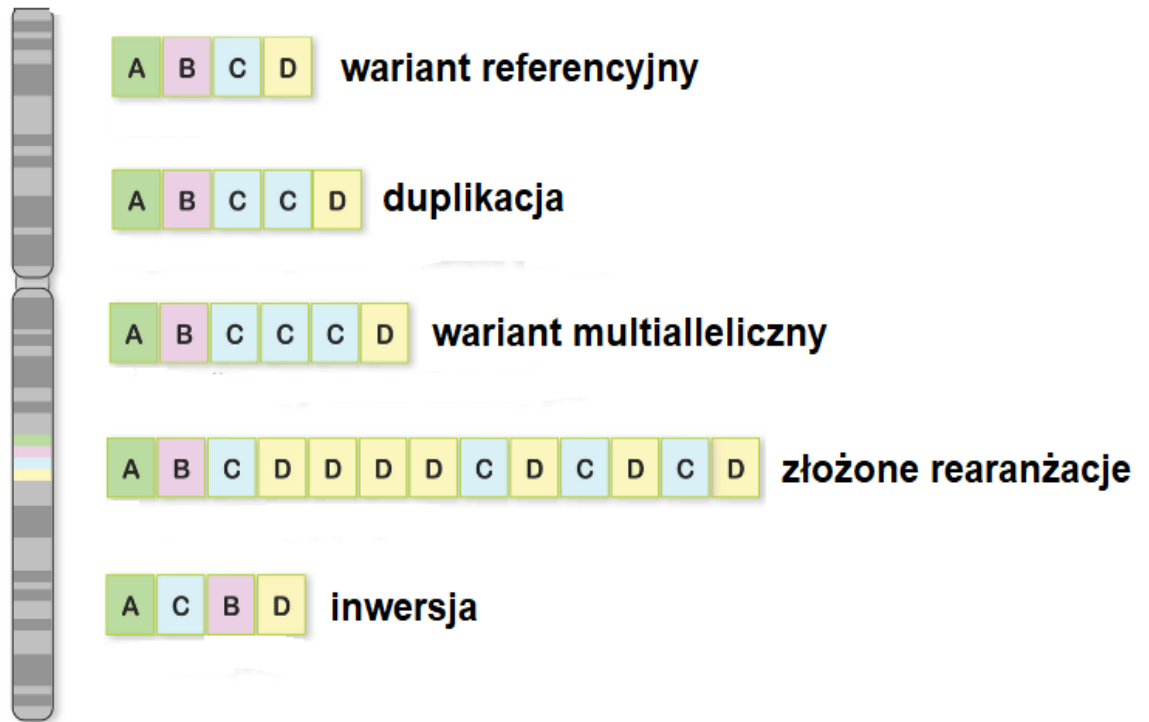
Jak przedstawiono w tabeli 1, należy również zwrócić uwagę na to, że wiele związków chemicznych jest jednocześnie substratami/induktorami czy też inhibitorami enzymów CYP, posiadającymi zdolność do wiązania się z nimi, co w konsekwencji nasila lub też hamuje aktywność tego systemu, zwiększając przy tym jednocześnie możliwość występowania interakcji między metabolitami substratów CYP450 [22-32].

Rola czynników genetycznych w aktywności enzymów CYP450, jest szczególnie istotna (także ze względu na udział w metabolizmie leków) w przypadku takich enzymów jak: CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 czy CYP3A4. Występują one w populacji w kilku odmianach polimorficznych – przez co, w zależności od genetycznie uwarunkowanej zdolności metabolizowania leków, będących substratami danego enzymu, można wyróżnić różne typy pacjentów (w zależności od szybkości metabolizmu leków) [24].

Dobrym przykładem genetycznego uwarunkowania procesów biodystrybucji jest zmienność CYP2D6, który katalizuje, w różnym zakresie, metabolizm około 25-30%

zarejestrowanych leków, a wśród nich szeroką gamę leków beta-adrenolitycznych (jak metoprolol, propranolol), antyarytmicznych (flekainid, ajmalina, propafenon), leków przeciwdepresyjnych (amitryptylina, fluoksetyna), ondansentronu, tamoksifenu, czy kodeiny. Gen kodujący ten enzym występuje w co najmniej w 78 allelicznych formach związanych ze zmniejszoną aktywnością lub brakiem aktywności enzymatycznej. W populacjach europejskich, w tym polskiej, główną przyczyną niedoboru aktywności *CYP2D6* jest obecność alleli *3 (SNP powodujący zmianę ramki odczytu -ang. *frameshift*), *4 (SNP powodujący zaburzenie składania mRNA - ang. *splicing defect*) i *5 (delecja genu). Wolni oraz ultraszybcy metabolizerzy różnią się nawet 5-15 krotnie szybkością metabolizmu substratów *CYP2D6* od osób homozygotycznych z dwoma allelami typu dzikiego. Główną przyczyną zmienionej aktywności *CYP2D6* są zmiany pojedynczych nukleotydów DNA (SNP, ang. *single nucleotide polymorphisms*), prowadzące do utraty aktywności kodowanego białka [22-24].

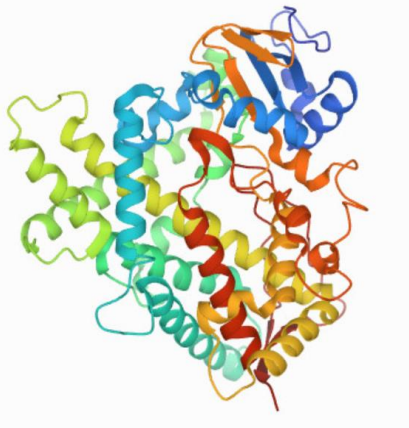
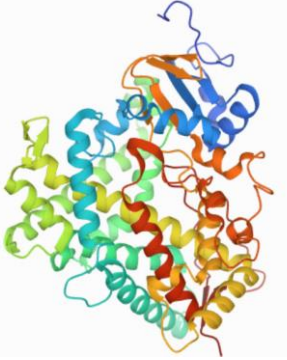
Jednonukleotydowe polimorfizmy nie są jednak jedynym typem rozpowszechnionych zmian w genie *CYP2D6*. Zmienność w zakresie ilości aktywnych kopii genu, określana jako zmienna liczba kopii (ang. *Copy Number Variation*, zmienność wynikająca z duplikacji, delecji lub innych kombinacji, rysunek 6) jest również bardzo istotna i może mieć znaczenie w doborze odpowiedniej terapii farmakologicznej czy też odpowiedniego dopasowania dawki leków. Różnice w liczbie kopii genu *CYP2D6* wpływają na końcowy fenotyp (aktywność enzymu). Zmiany genetyczne powodują występowanie różnic w układach enzymatycznych metabolizujących leki poprzez wpływ na ekspresję genów, co skutkuje zmienną ilością białka oraz różną aktywnością, jeśli chodzi o jego funkcje [22-24].



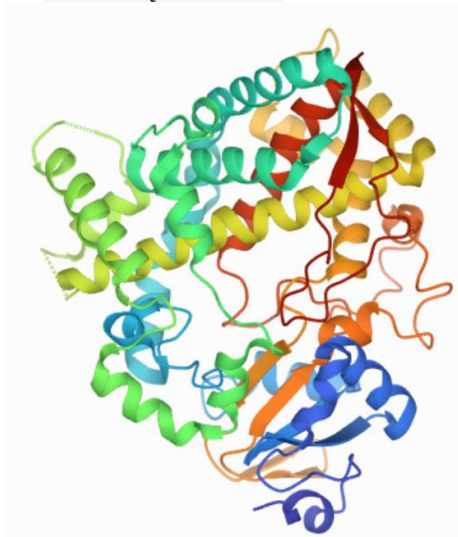
Rysunek 6. Zmienność genetyczna DNA. Za: [147].

W przypadku kodeiny, będącej prolekiem aktywowanym przez CYP2D6, pacjenci pozbawieni aktywności enzymu nie odnoszą korzyści z przyjmowania tego leku (brak efektu terapeutycznego), natomiast pacjenci z aktywnymi wieloma formami genu wykazują podwyższoną aktywność enzymu - są bardziej narażeni na toksyczne, zbyt wysokie stężenie morfiny (metabolitu kodeiny powstającego w reakcji katalizowanej przez CYP2D6). Dlatego też, w zależności od posiadanej allelicznej formy genu, wyróżnia się: wolnych metabolizerów (*ang. poor metabolizers*, ze względu na brak funkcjonalnego allela z powodu mutacji punktowych lub delecji obu alleli obserwowany jest zwolniony metabolizm leków), pośrednich metabolizerów (*ang. intermediate*), szybkich metabolizerów (*ang. extensive*, charakteryzujących się wydajnym metabolizmem leków) oraz ultraszybkich metabolizerów (*ang. ultrarapid*, u których występuje wiele kopii genu, co skutkuje znacznie podwyższoną aktywnością i przyspieszonym metabolizmem leków) [22-32].

Tabela 1. Najważniejsze enzymy biorące udział w metabolizmie leków. *Za: [33-67]*

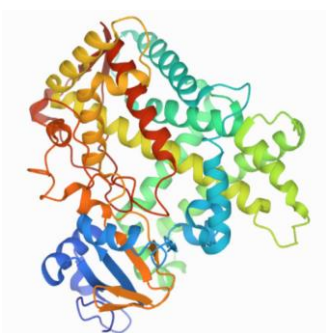
1. ENZYMY BIORĄCE UDZIAŁ W METABOLIZMIE LEKÓW		
NAZWA	FUNKCJA	PRZYKŁADOWE SUBSTRATY
<p>CYP1A1 numer Uniprot: P04798 masa cząsteczkowa: 227.52 kDa</p>  <p>Rysunek 7. Struktura krystaliczna CYP1A1. <i>Za: [33, 35, 45]</i></p>	<p>- klasyfikacja: oksydoreduktazy - enzym, będący częścią układu cytochromu P450, - odpowiada za metaboliczną aktywację prokarcynogenów w do ich aktywnych metabolitów - ulega głównie ekspresji pozawątrobowej</p>	<p>- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne - difloksacyna - teofilina, - kwasy tłuszczowe</p>
<p>CYP1A2 : numer Uniprot: P05177 masa cząsteczkowa: 57.18 kDa</p>  <p>Rysunek 8. Struktura krystaliczna CYP1A2. <i>Za: [39, 40, 46, 47]</i></p>	<p>- klasyfikacja: oksydoreduktazy - enzym odpowiedzialny za metabolizm około 10% - 15% leków - istotne znaczenie w bioaktywacji mutagenów, w tym N-hydroksylacji aryloamin.</p>	<p>- teofilina - kofeina - klozapina - olanzapina, - tyzanidyna - duloksetyna</p>

CYP3A4:
numer Uniprot: P08684
masa cząsteczkowa: 56.84 kDa



Rysunek 9. Struktura krystaliczna CYP3A4. Za: [35-38, 48, 49]

CYP2B6:
numer Uniprot: P20813
masa cząsteczkowa 336.11 kDa



Rysunek 10. Struktura krystaliczna CYP2B6. Za:[33-38, 50-54]

- klasyfikacja:
oksydoreduktazy
- główny enzym metabolizujący leki, biorący udział w 40-45% wszystkich reakcji I fazy.

- substraty endogenne, np. hormony sterydowe
- bierze udział w metabolizmie ponad 1900 leków, z których 1033 są także substratami dla tego enzymu. Wśród nich na przykład nowoczesne leki stosowane w leczeniu HCV:
- simeprewir
- paritaprewir
- grazoprewir
- woksilaprewir
- ombitaswir
- elbaswir
- welpataswir
- boceprewir
- asunoprewir
- dasabuwir
- deklataswir
Ale także inne leki:
- makrolidy (np. erytromycyna),
- leki przeciwpadaczkowe (np. fenobarbital)
- erytromycyna
- inhibitory fosfodiesterazy typu 5 (wardenafil),

- klasyfikacja:
oksydoreduktazy
- stanowi około 1% wszystkich enzymów obecnych w układzie enzymatycznym w wątrobie

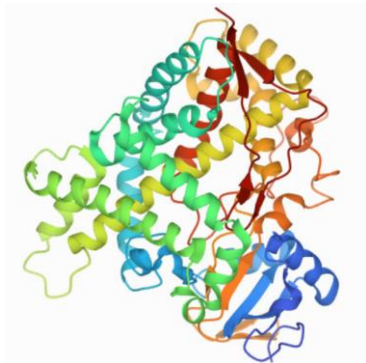
- bupropion,
- cyklofosfamid,
- efawirenz,

W leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C stosowany jest także: welpataswir

CYP2E1:

numer Uniprot: P05181

masa cząsteczkowa: 111.59 kDa

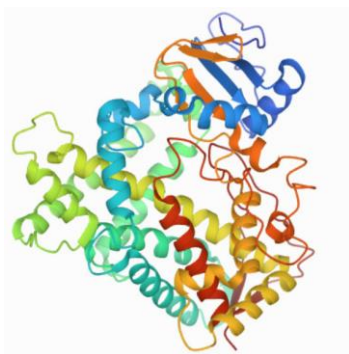


Rysunek 11. Struktura krystaliczna CYP2E1. Za: [39, 50]

CYP2C8:

numer Uniprot: P10632

masa cząsteczkowa: 109.95 kDa



Rysunek 12. Struktura krystaliczna CYP2C8. Za: [33, 52, 53, 55]

- klasyfikacja:
oksydoreduktazy

- stanowi około
7% układu
mikrosomalnego
wątroby

- paracetamol
- alkohol etylowy

- klasyfikacja:
oksydoreduktazy

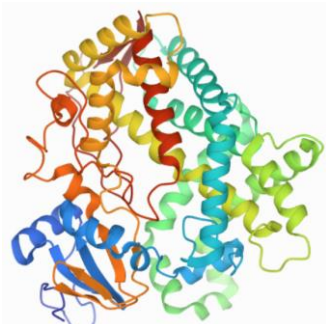
- bierze udział w
metabolizmie
około 5%
stosowanych
obecnie leków

- pioglitazon
- werapamil,
- chlorochina,
- paklitaksel,
- ibuprofen,

CYP2D6:

numer Uniprot: P10635

masa cząsteczkowa: 219.96 kDa



Rysunek 13. Struktura krystaliczna CYP2D6. Za: [33, 40, 54, 56, 58]

- **klasyfikacja:**
oksydoreduktazy

-odpowiada za metabolizm około 20% leków,

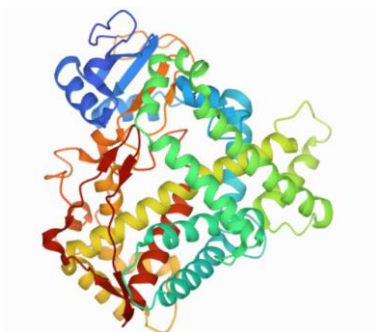
-brak substratów endogennych

-Leki antydepresyjne, arytmiczne, beta-blokery i opioidowe leki przeciwbólowe są typowymi substratami dla tego enzymu.

CYP2C9:

numer Uniprot: P11712

masa cząsteczkowa: 110.19 kDa



Rysunek 14. Struktura krystaliczna CYP2C9. Za: [41, 42, 55, 57, 60]

- **klasyfikacja:**
oksydoreduktazy

- enzym stanowiący około 18% wszystkich białek w układzie mikrosomalnym wątroby,

-bierze udział w metabolizmie około 25% zarejestrowanych leków

-warfaryna,

-tolbutamid,

-fenytoina,

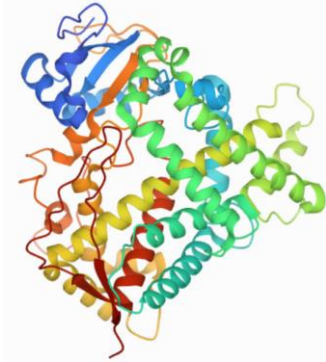
-losartan,

-diklofenak

CYP2C19:

numer Uniprot: P33261

masa cząsteczkowa: 222.19 kDa



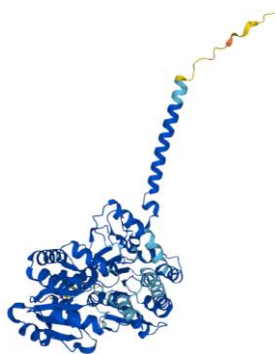
Rysunek 15. Struktura krystaliczna CYP2C9. Za: [28, 37, 61]

1. UDP- GLUKURONYLOTRANSFERAZY

UGT1A1

numer Uniprot: P22309

masa cząsteczkowa : 59,591 Da



Rysunek 16. Struktura krystaliczna UGT1A1. Za:[62]

- klasyfikacja:
oksydoreduktazy

-enzym
stanowiący około
16% wszystkich
białek w układzie
mikrosomalnym
wątroby

-citalopram,
-klomipramina,
-klopidogrel,
-diazepam,
-omeprazol,
-S-mefenytoina,

-enzymy należące
do II fazy
metabolizmu

-katalizują
przyłączenie
kwasu
glukuronowego
do lipofilowego
substratu
zawierającego
nukleofilową
grupę funkcyjną.
Nadrodzina UGT
składa się z
izoenzymów o
różnej swoistości
substratowej oraz
odmiennym
profilu ekspresji
w
poszczególnych
tkankach.

- związki hydrofobowe,
zazwyczaj o strukturze
pierścieniowej, zawierające
nukleofilowe atomy tlenu, azotu
lub siarki. Glukuronidacji
ulegają przede wszystkim
ugrupowania hydroksylowe,
karboksylowe aminowe
(pierwszo-, drugo-
i trzeciorzędowe), tiolowe,
a także kwaśne atomy węgla.

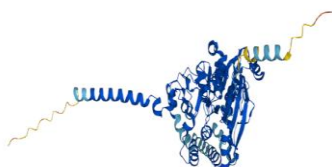
-substraty endogenne: bilirubina,
kwasy żółciowe, tłuszczowe,
hormony steroidowe, hormony
tarczycy
i witaminy rozpuszczalne
w tłuszczach,

-Substraty egzogenne UGT
to substancje wprowadzane
do organizmu z pożywieniem,
zanieczyszczenia powietrza,
kancerogeny oraz liczne grupy
leków: przeciwbólne,

UGT1A3

numer Uniprot: P35503

masa cząsteczkowa: 60,338 Da

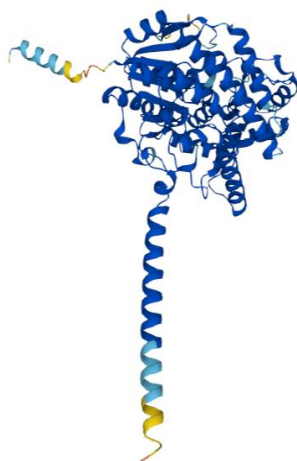


Rysunek 17. Struktura krystaliczna UGT1A3. Za:[63]

UGT2B7

numer Uniprot: P16662

masa cząsteczkowa: 60,721 Da



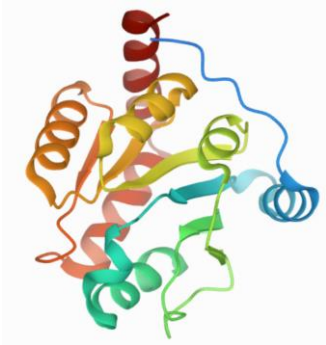
Rysunek 18. Struktura krystaliczna UGT2B7. Za:[64]

przeciwwirusowe,
przeciwnowotworowe,
przeciwpadaczkowe,
niesteroidowe
leki
przeciwzapalne,
benzodiazepiny

UGT2B15

numer Uniprot: P54855

masa cząsteczkowa: 61,036 Da

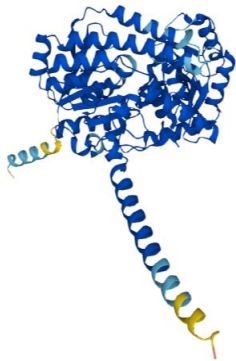


Rysunek 19. Struktura krystaliczna UGT2B15. Za:[65]

UGT2B17

numer Uniprot: O75795

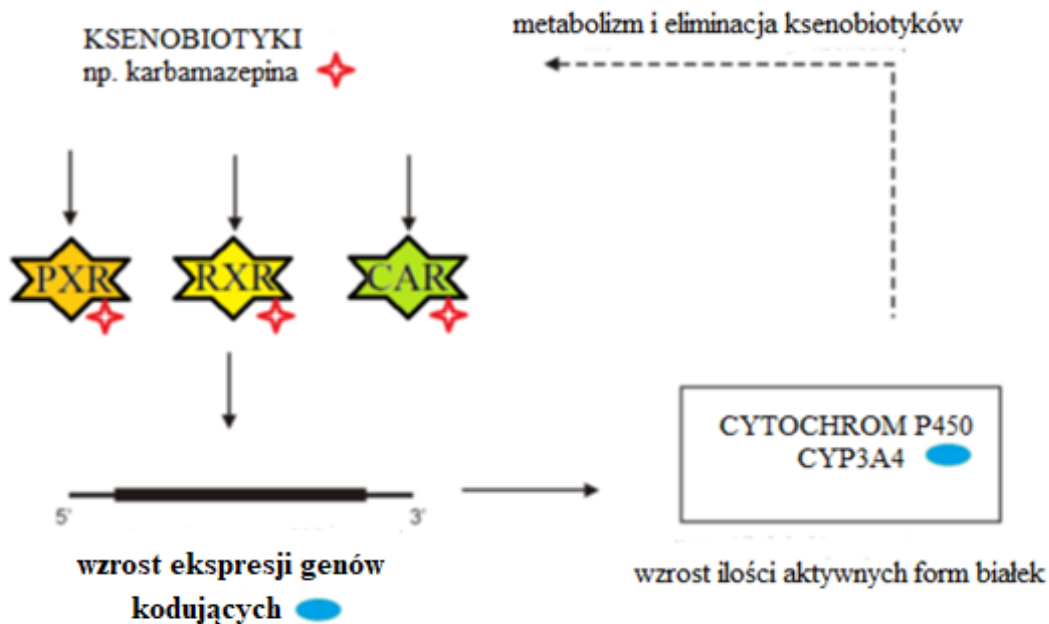
masa cząsteczkowa: 61,095 Da



Rysunek 20. Struktura krystaliczna UGT2B17. Za:[66, 67]

Dodatkowo należy wspomnieć, że wpływ na ekspresję genów cytochromu P450 mają także inne przyczyny, jak chociażby aktywacja czynników transkrypcyjnych, regulujących aktywność enzymów. Aktywność metaboliczna białek wątrobowych, związanych z metabolizmem leków jest regulowana głównie przy udziale grupy tzw. receptorów jądrowych

(ang. *nuclear receptors*), t.j. białek obecnych w cytoplazmie, które pod wpływem działania ksenobiotyku (liganda) ulegają aktywacji, są transportowane do jądra komórki i pobudzają lub też hamują ekspresję zależnych od nich genów. Związanie odpowiedniego liganda do ksenosensora (receptora regulującego układy detoksykacyjne) powoduje powstanie aktywnej postaci czynnika transkrypcyjnego i inicjację ekspresji genu. Wśród najważniejszych ksenosensory należą wymienić PXR (ang. *pregnane X receptor*), RXR (ang. *retinoid X receptor*), CAR (ang. *constitutive androstane receptor*), SXR (ang. *steroid xenobiotic receptor*), AHR (ang. *aryl hydrocarbon receptor*), czy też HNF (ang. *hepatocyte nuclear factor*). Przykładowo, ekspresja genu kodującego CYP3A4 jest indukowana przez wiele różnych ligandów (rysunek 21). Te ligandy wiążą się z receptorem pregnanu X (PXR). Aktywowany kompleks PXR tworzy heterodimer z receptorem retinoidowym X (RXR), który wiąże się z sekwencją określaną jako XREM genu *CYP3A4*. XREM jest regionem regulatorowym genu *CYP3A4*, a jego związanie z PXR powoduje współdziałanie z regionami promotora genu, co skutkuje zwiększoną transkrypcją i ekspresją *CYP3A4*. Aktywacja heterodimeru PXR/RXR inicjuje więc transkrypcję genu *CYP3A4* [68-70]. Część interakcji lekowych wynika właśnie z aktywacji receptorów jądrowych przez niektóre farmaceutyki i substancje zawarte w diecie, co w konsekwencji przyspiesza metabolizm innych leków i zmniejsza ich skuteczność farmakologiczną. Przykładem może być silna indukcja CYP3A4 pod wpływem starszych leków przeciwpadaczkowych (np. fenobarbitalu czy karbamazepiny), prowadząca do obniżenia stężeń równoległe przyjmowanych substratów enzymu (np. cyklosporyna, niektóre statyny).



Rysunek 21. Wpływ liganda (karbamazepiny) na ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące leki (CYP3A4) z udziałem PXR, RXR, CAR. *Przykład autoindukcji – karbamazepina jest silnym induktorem i też substratem CYP3A4, przez co sama “przyspiesza swój metabolizm”, co wymaga zwiększenia dawki w trakcie terapii. Opracowanie własne. Za: [68].*

Wśród czynników wpływających na biodystrybucję leków można również wymienić białka transportujące leki, które dopełniają procesy farmakokinetyczne leków w organizmie. Transportery leków są dużą grupą białek, biorącą udział w absorpcji, dystrybucji i eliminacji z tkanek różnych substancji endogennych (np. steroidy, kwasy żółciowe, prostaglandyny) i egzogennych (ksenobiotyki, inne leki i związki chemiczne). Białka te można podzielić na dwie główne rodziny: transportery ABC (*ang. ATP-binding cassette*) i SLC (*ang. solute carrier*). Białka z nadrodziny ABC, pełnią rolę “molekularnych pomp”, wyrzucających substraty z komórki z udziałem energii z hydrolizy ATP (*ang. efflux transporters*). Do najważniejszych transporterów ABC zaangażowanych w transport leków można zaliczyć białka podrodziny MRP (ABCC), glikoproteinę P (P-gp, MDR1, ABCB1), oraz BCRP (ABCG2). Z kolei niezwykle istotnym, z punktu widzenia transportu substancji endogennych, takich jak kwasy żółciowe i sole żółciowe, jest między innymi białko BSEP (ABCB11). Lokalizacja transporterów ABC w hepatocytach zależy od tego, czy „wyrzucają”

one substraty do krwi, czy też do żółci. W błonie podstawno-bocznej komórek wątroby znajdują się białka związane z opornością wielolekową: MRP3 (ABCC3), MRP4 (ABCC4) i MRP6 (ABCC6). Transportery zlokalizowane na powierzchni kanalikowej hepatocytów to między innymi: P-gp (MDR1, ABCB1), BSEP (ang. *bile salt export pump*, ABCB11), BCRP (ang. *breast cancer resistance protein*, ABCG2) i MRP2 (ang. *multidrug resistance-associated protein 2*, ABCC2) [71-73].

Spośród transporterów SLC, istotną rolę w transporcie dokomórkowym ksenobiotyków pełnią białka z rodziny OATP, OAT i OCT [3,4]. Transportery znajdujące się w błonie podstawno-bocznej hepatocytów obejmują trzech przedstawicieli tej samej rodziny: OATP [OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3), i OATP2B1 (SLCO2B1)], transporter organicznych anionów 2 (OAT2; SLC22A7) i transporter kationów organicznych 1 (OCT1, SLC22A1) [71-73].

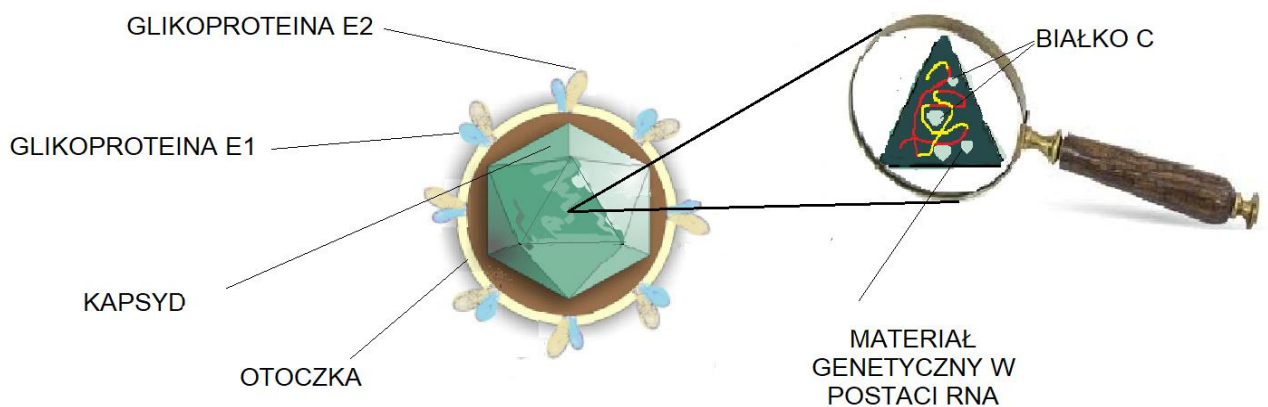
1.2. WIRUSOWE CHOROBY WĄTROBY

Wydolność wątroby, w tym jej zdolność do prawidłowego metabolizowania leków, ulega zmianom w stanach patologicznych. Stan, w którym prawidłowe funkcjonowanie wątroby jest zaburzone, może również być wywołany zakażeniem różnego rodzaju drobnoustrojami chorobotwórczymi. Choroby wątroby o podłożu infekcyjnym mogą być wywołane przez wirusy, takie jak: pierwotnie hepatotropowe wirusy zapalenia wątroby typu: A, B, C, D i E oraz wtórnie hepatotropowe wirusy: EBV, CMV, HSV-1, HSV-2, ECHO, różyczki, ospy wietrznej, odry, adenowirusy, czy też wirus żółtej gorączki [8].

Choroby wirusowe wątroby są trudne do rozpoznania na podstawie obrazu klinicznego, a jednym z najniebezpieczniejszych wirusowych czynników chorobotwórczych jest wirus zapalenia wątroby typu C – HCV (ang. *Hepatitis C virus*), który powoduje przewlekły stan zapalny wątroby o różnym nasileniu. W przebiegu przewlekłego zakażenia HCV, u ponad 50% chorych może wystąpić marskość wątroby i nowotwory, przede wszystkim rak wątrobokomórkowy [74]. Ważnym faktem jest również to, że zakażenie wirusem HCV przez wiele lat może przebiegać w sposób bezobjawowy lub skąpoobjawowy, co sprawia, że duża część zakażonych nie wie o tym fakcie i pozostaje niezdiagnozowana. W populacji Polski przeciwciała anti-HCV są stwierdzane u około 2% ludności, z których tylko część wykazuje

obecność HCV RNA, będącego wskaźnikiem aktywnego zakażenia. Według WHO, globalnie, zainfekowanych wirusem HCV jest około 170 000 000 ludzi, a wirusowe zapalenie wątroby typu C jest przyczyną około 300 000 zgonów rocznie [74,75].

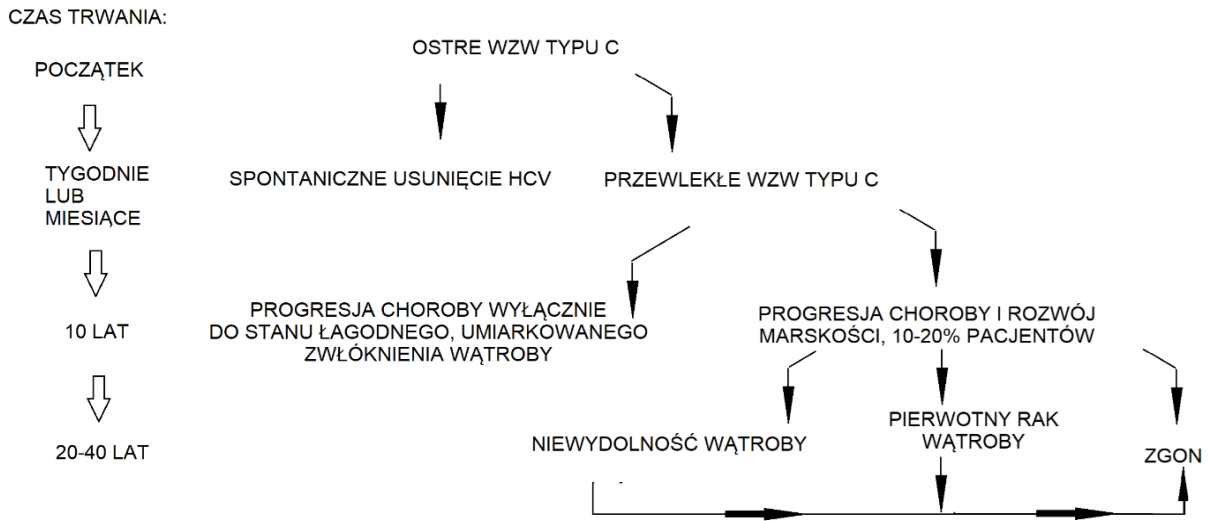
Wirus HCV z rodziny *Flavavirydae* należy do otoczkowych RNA wirusów. Wyróżnia się iksohedralną budową kapsydu, w którego skład wchodzi materiał genetyczny w postaci ssRNA o długości 9,6 kb o dodatniej polarności oraz białko C. Wszystkie te struktury otoczone są lipidową otoczką (rysunek 22) [76].



Rysunek 22. Budowa wirionu HCV. Za: [97], zmodyfikowano.

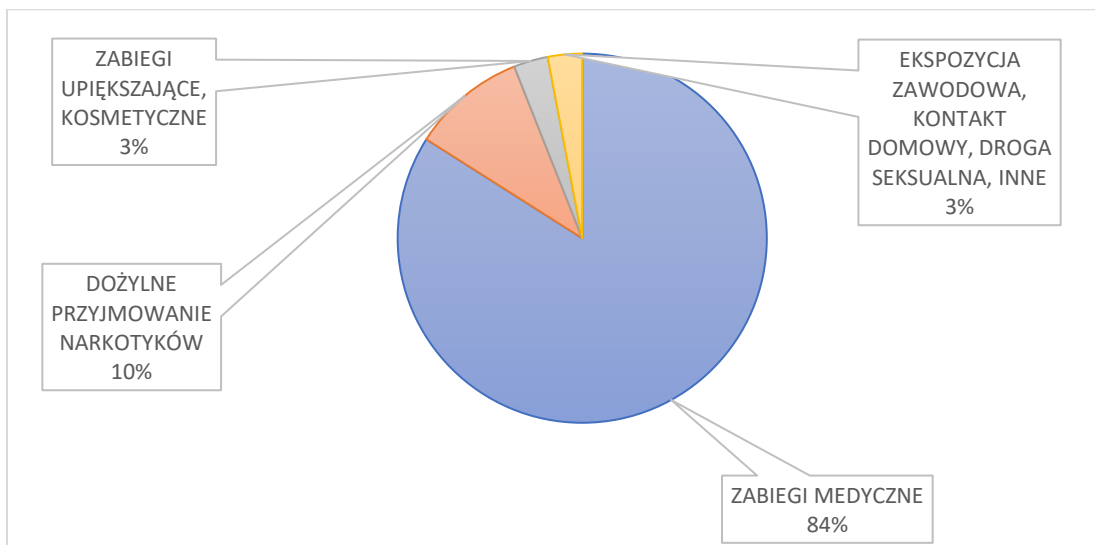
Wirusowe zapalenie wątroby typu C może mieć różny przebieg (rysunek 23). Wirus HCV w około 15-20% przypadków zakażeń wywołuje ostre zapalenie wątroby. W jego przebiegu, po przebyciu ostrej fazy choroby, u około 50-80% przypadków przybiera ona postać przewlekłą. Dodatkowo mogą wystąpić niekorzystne skutki w postaci zmian poza wątrobą, takie jak: insulinooporność, cukrzyca typu 2 oraz uszkodzenie nerek. Ciekawym faktem jest, że około 15-40% pacjentów zakażonych wirusem HCV spontanicznie wraca do zdrowia [76-82].

PRZEBIEG NATURALNY WZW TYPU C



Rysunek 23. Przebieg naturalny HCV. Opracowanie własne. Za: [83].

Głównym czynnikiem wywołującym zakażenie HCV jest ekspozycja na zakażoną krew, szczególnie podczas trwania zabiegów medycznych i procedur medycznych, takich jak iniekcje, leczenie stomatologiczne, ale także zabiegów kosmetycznych, podczas których zasady bezpieczeństwa nie są odpowiednio przestrzegane (rysunek 24). Innym źródłem zakażenia jest także przyjmowanie narkotyków drogą dożylną, wirus ulega także transmisji drogą płciową [84, 85].

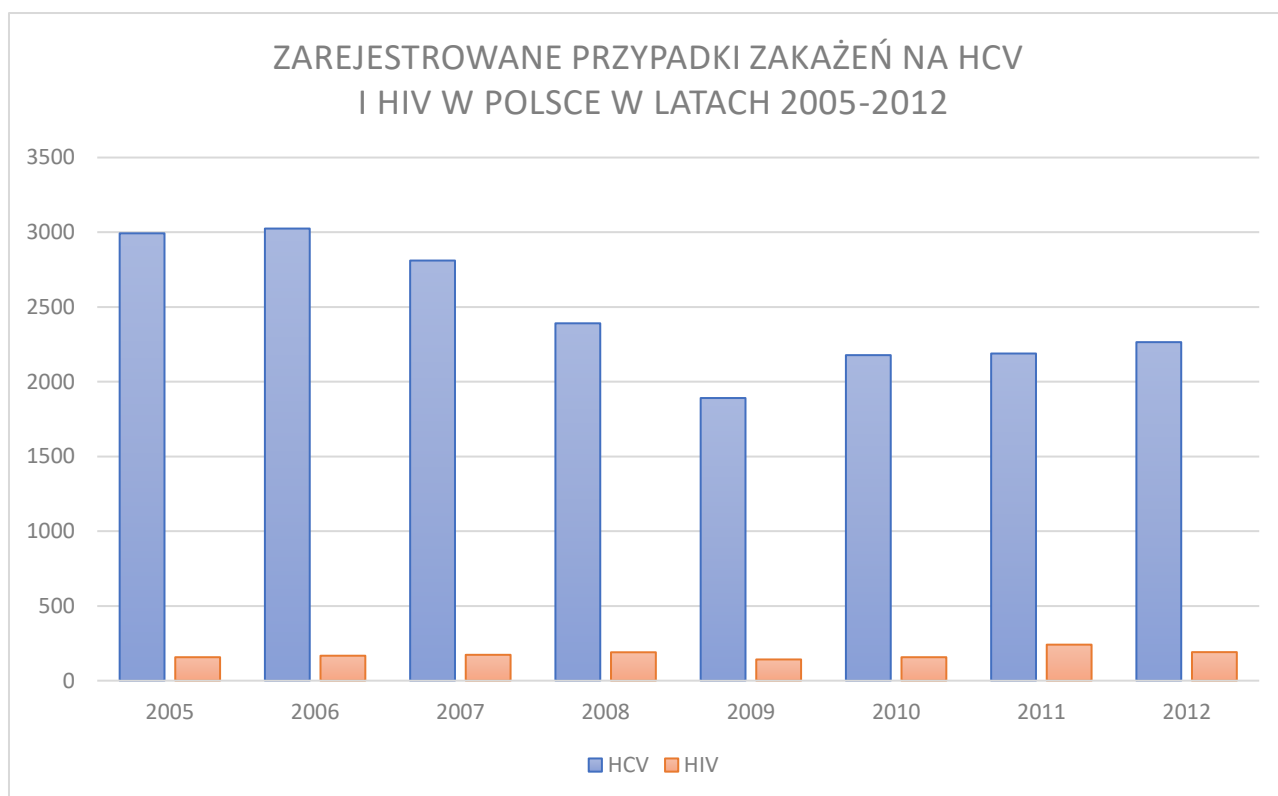


Rysunek 24. Źródła zakażeń HCV w Polsce w 2010 r. Za: [86].

Na przestrzeni lat wyróżniono 6 głównych typów wirusa, choć ze względu na heterogeny charakter sekwencji zawartych w wirusowym genomie - HCV klasyfikuje się aż na 11 rodzajów genotypów, które mogą różnić się między sobą układem nukleotydów nawet o 50% [76, 88]. Każdy z genotypów powoduje inny przebieg choroby, jeśli chodzi o rozwój, nasilenie objawów i skutki zakażenia. Rozmieszczenie geograficzne genotypów jest zróżnicowane. Globalnie, najbardziej rozpowszechnionym jest genotyp 1 (46%), a następnie 3, 2 i 4. Rodzaj genotypu również ma wpływ na leczenie antywirusowe – na przykład genotypy 1 i 4 są bardziej wrażliwe na leczenie interferonem, niż genotypy 2 i 3 [8,76, 88].

W Polsce zapadalność na HCV w 2015 roku wynosiła 11,3/100 000, a dominującym genotypem wirusa był: typ 1b (79,4%), typ 3 (13,8%), typ 4 (4,9%) i typ 2 (0,1%), typ 6 (0,1%) oraz inne (1,6%) [8,94]. Natomiast według innych źródeł - genotyp: 1b (82%), 3 (11,3%), 4 (3,5%), oraz sporadycznie: 2, 5 i 6 [88, 89].

W latach 2017 i 2018 rozpoznano w Polsce (dotyczy łącznie zakażeń ostrych i przewlekłych) 4010 i 3443 przypadki, co daje zapadalność na poziomie odpowiednio: 10,44/100 000 (2017) i 8,96/100 000 (2018). W literaturze podaje się, że ogółem w Polsce przeciwciała anty-HCV występują u około 570 000 osób, a wśród nich jest około 150 000 osób zakażonych z wykrywalnym w osoczu RNA HCV (aktywna infekcja). Co ważne, z danych gromadzonych od 1997 roku przez Państwową Inspekcję Sanitarną oraz WHO wynika, że tylko u około 30% osób zakażenie jest prawidłowo zdiagnozowane, a leczenie w Polsce otrzymuje do 8 000 pacjentów w danym roku. Dane te wskazują, że większość zarażonych osób nie wie o tym, że jest nosicielem HCV [83]. Ze względu na fakt, że regulacje dotyczące monitorowania epidemiologicznego HCV zmieniały się wielokrotnie od 1997 roku, a najdłuższym okresem, w którym dane dotyczące zachorowań były zbierane w Polsce, w sposób jednorodny, według tych samych wytycznych, były lata 2005-2012 (rysunek 25), nie można w sposób ciągły ocenić jednoznacznie, jak wyglądała sytuacja epidemiologiczna w tym zakresie na przestrzeni dłuższego okresu. Jednakże na podstawie dostępnych danych można zauważyć, że skala występowania przypadków zachorowania na HCV utrzymuje się wciąż na wysokim poziomie (blisko 2000 przypadków wykrytych zachorowań rocznie). Porównując to z innymi chorobami zakaźnymi, takimi jak infekcje HIV, możemy zauważyć, że na przestrzeni lat 2005-2012, co roku przybywa wielokrotnie więcej nowych pacjentów zakażonych HCV niż HIV, a to przecież HIV jest w świadomości społecznej postrzegany jako większe zagrożenie [89].



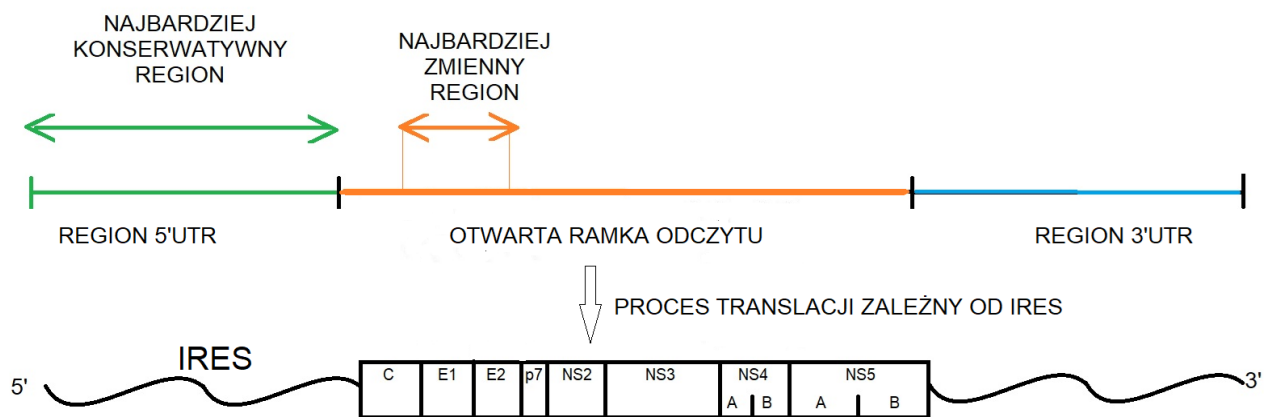
Rysunek 25. Przypadki zachorowań na HCV i HIV w Polsce w latach 2005-2012. Opracowanie własne. Za: [87]. Zmodyfikowano.

W celu projektowania nowych leków antywirusowych istotnym jest poznanie budowy HCV, właściwości jego RNA oraz głównych białek wirusa. Wirusowy polipeptyd, kodowany przez RNA, składa się z przynajmniej 10 białek. W budowie genomu wirusa HCV można wyróżnić trzy zasadnicze regiony (rysunek 26), które stanowią bazę do składania wirusa, są to [76, 91, 92, 93]:

- a) **REGION 5'UTR**, który zawiera regiony niekodujące, ale za to o najbardziej konserwatywnym charakterze, jest z tego względu wykorzystywany do diagnostyki wirusologicznej. Jako, że jest to tzw. region niepodlegający translacji (*ang. untranslated region*) pełni on swoiste funkcje regulatorowe. W tym rejonie znajduje się niezależne od kapo (czyli struktury czapeczki, odgrywającej kluczową rolę w procesie inicjacji translacji) miejsce wiązania z rybosomem IRES (*ang. internal ribosomal entry side*), które w alternatywny sposób rozpoczyna proces translacji wirusa w komórkach. Niezależny od czapeczki tryb inicjacji translacji dotyczy białek, które odgrywają bardzo ważną rolę podczas cyklu komórkowego, apoptozy, odpowiedzi na bodźce stresowe i rozwoju raka oraz białek wirusowych. Region 5'UTR składa się z 341 nukleotydów.

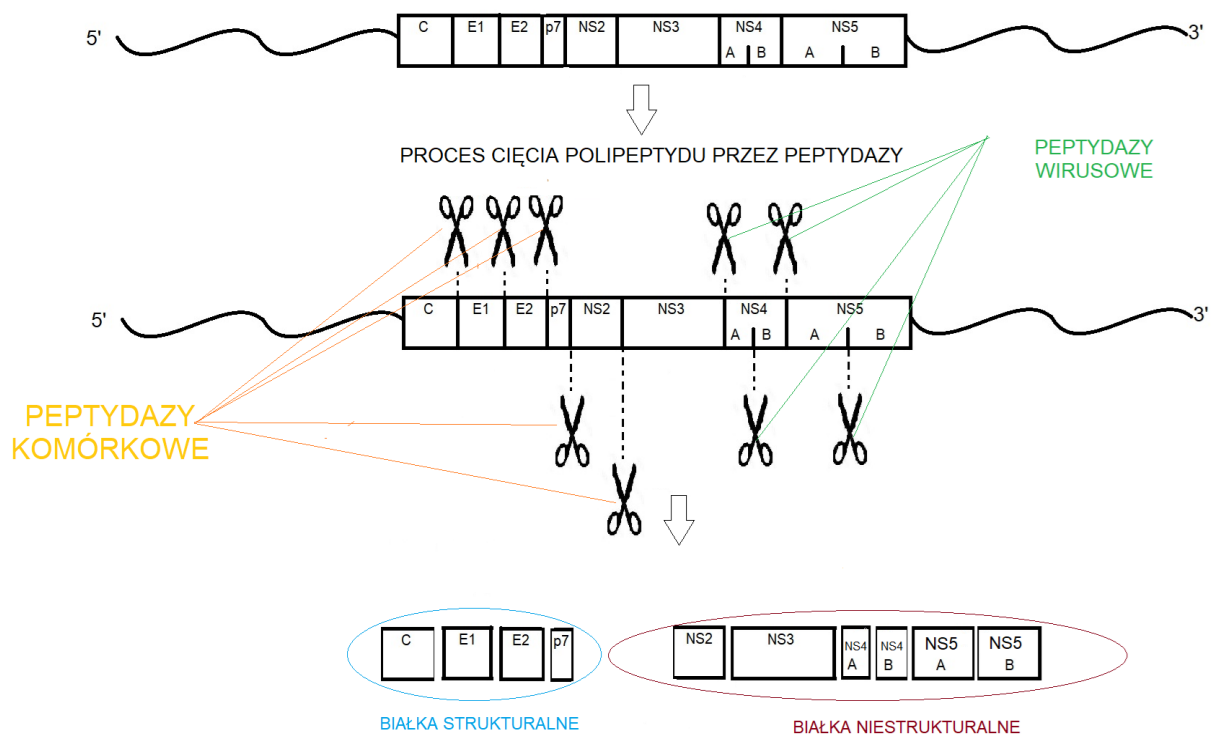
b) **OTWARTA RAMKA ODCZYTU:** składa się z ponad 9000 nukleotydów, są to sekwencje kodujące polipeptyd o długości ponad 3000 aminokwasów, który ulega procesom translacyjnym i potranslacyjnym, katalizowanym przez wirusowe oraz znajdujące się w komórce gospodarza peptydazy, w wyniku czego powstaje co najmniej 10 różnych białek (rysunek 27), których kolejność w polipeptydzie jest następująca: NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH [82, 100-102]. Otwarta ramka odczytu zawiera regiony, które ulegają najczęstszym mutacjom, szczególnie sekwencje kodujące białko E1 i E2.

c) **REGION 3'UTR:** to region o niedużym rozmiarze, w którym wyróżnia się region X, który jest istotny dla rozpoczęcia kopiowania wirusowego materiału genetycznego [76].



Rysunek 26. Budowa genomu i wirusa HCV. *Na podstawie: [76], zmodyfikowane.*

Peptydazy zawarte w hepatocytach są niezbędne w procesie obróbki potranslacyjnej białka wirusowego. Umożliwiają one hydrolizę polipeptydu (rysunek 27) pomiędzy fragmentami: C-E1, E1-E2, E2-p7 oraz p7-NS2, a także pełnią funkcje pomocnicze w procesie dojrzewania białka w obrębie retikulum endoplazmatycznego. Do peptydaz komórkowych, biorących udział w tych procesach zalicza się: peptydazę sygnałową oraz peptydazę odcinającą sekwencję sygnałową. Natomiast peptydazy pochodzenia wirusowego umożliwiają powstawanie cięcia pomiędzy fragmentami: NS2 i NS3, w tym procesie udział bierze metaloproteinaza NS2 zależna od jonów Zn⁺ oraz NS3/A4 - proteaza serynowa, umożliwiająca powstawanie cięć pomiędzy fragmentami: NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B. Co ciekawe, po dokonaniu obróbki potranslacyjnej, białka te pozostają w obrębie błony wewnątrzkomórkowej [76, 94-96].



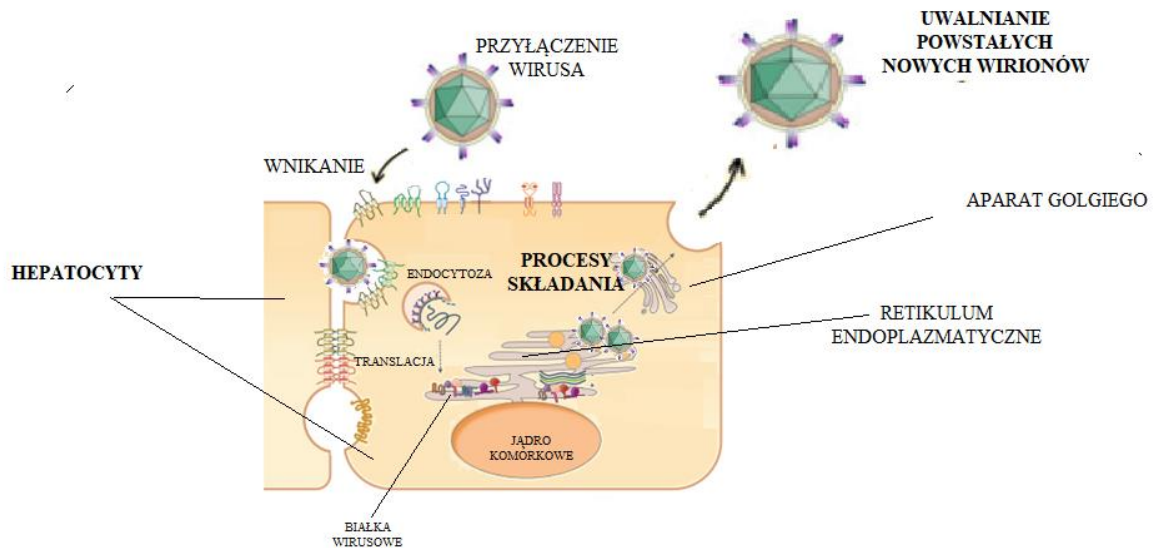
Rysunek. 27. Proces cięcia polipeptydu wirusa HCV z rozróżnieniem udziału czynników komórkowych (gospodarza) i wirusowych (HCV). *Na podstawie: [76], zmodyfikowane.*

Ze względu na pełnione funkcje, białka wirusowe można podzielić na strukturalne i niestrukturalne. Do białek strukturalnych zalicza się białka: C, E1, E2, p7, natomiast do niestrukturalnych (enzymatycznych): NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B.

Wśród białek strukturalnych, jednym z kluczowych jest białko C, które bierze, między innymi, udział w tworzeniu nowych wirionów potomnych poprzez wiązanie materiału genetycznego wirusa. Badania wykazały także, że ma zdolność do hamowania apoptozy i wspierania replikacji innych wirusów, np. HBV. W przypadku białek otoczkowych, wyróżnia się glikoproteiny E1 i E2 o różnych sekwencjach, w zależności od genotypu wirusa HCV. W komórce gospodarza występują w postaci hydrofobowych kompleksów połączonych z domenami siateczki śródplazmatycznej, a ich główną rolą jest udział we wnikaniu wirusa do komórki (rysunek 27). Białka niestrukturalne pełnią swoją rolę w procesach replikacji HCV w komórkach gospodarza [76].

Oprócz poznania struktury wirionu HCV, ważnym elementem jest wiedza z zakresu jego funkcjonowania, w tym dotycząca przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa,

ponieważ daje to możliwość uzyskania szeregu informacji, które mogą być użyteczne w procesie ulepszania istniejących i tworzenia nowych leków antywirusowych (rysunek 28). Cykl replikacji wirusa HCV składa się z kilku etapów, które potencjalnie mogą być celem działania leków przeciwwirusowych.



Rysunek 28. Cykl replikacyjny wirusa HCV. Na podstawie: [90, 91, 97]. Zmodyfikowano.

Cykl replikacyjny wirusa HCV [76, 94-102] rozpoczyna się od przyłączenia wirionu do swoistych receptorów, znajdujących się na powierzchni hepatocytów (rysunek 28), co stanowi ETAP I, który zależy od poziomu regulacji endocytozy i fuzji zależnej od pH. Najpierw cząsteczka wirusa przyłącza się do odpowiedniego receptora na błonie hepatocytu. Wśród receptorów, umożliwiających wejście cząsteczki wirusa, wyróżnia się: receptor tetraspaniny CD81, receptor SR-B1 (receptor rozpoznający zmodyfikowane przez procesy utleniania lub acetylacji lipoproteiny o małej gęstości B1), receptor LDL (lipoprotein o małej gęstości), receptor dla małych cząsteczek adhezyjnych DC-SIGN oraz L-SIGN (rysunek 29).

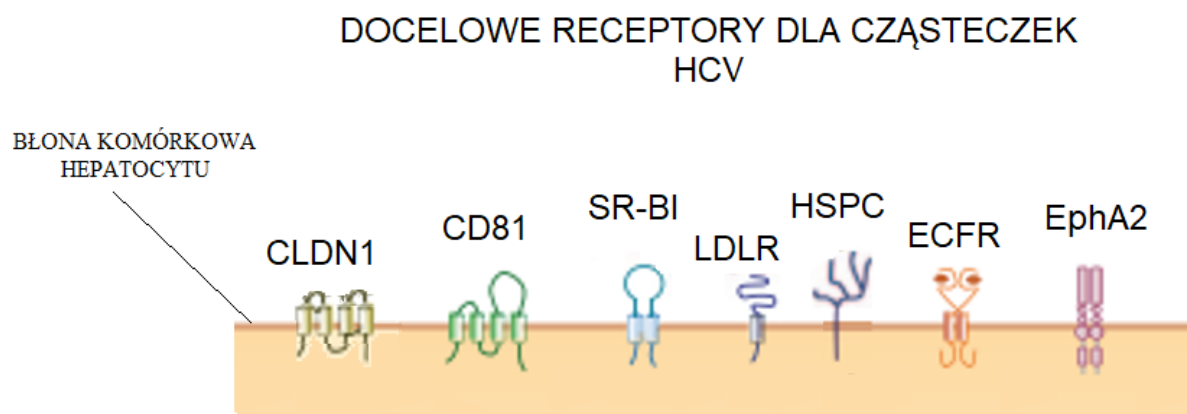
Po przyłączeniu cząsteczki wirionu rozpoczyna się II ETAP, w trakcie którego kompleks wirionu z receptorem daje sygnał komórce hepatocytarnej, że jest gotowy do wniknięcia. Wirus zostaje internalizowany, a jego nukleokapsyd zostaje uwolniony do wnętrza komórki.

W III ETAPIE rozpoczyna się uwalnianie materiału genetycznego wirusa.

Uwolniony materiał genetyczny zostaje w IV ETAPIE poddawany procesom transkrypcji i translacji. Procesy te zachodzą w membranie, zwanej kompleksem replikacyjnym, gdzie dochodzi do namnażania i dojrzewania struktur poliproteiny wirusa HCV.

V ETAPEM, jest zamknięcie genomu wirusa w kapsyd. Dzieje się to w obrębie retikulum endoplazmatycznego, gdzie nowo utworzone nukleokapsydy są na tym etapie pokrywane otoczką lipidową i dojrzewają w aparacie Golgiego.

Końcowym, VI ETAPEM jest uwalnianie nowo utworzonych wirionów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej na zasadzie egzocytozy, dzięki czemu mogą się one przyłączyć do kolejnej komórki (hepatocytu) i powtórzyć cały cykl.



Rysunek 29. Receptory hepatocytarne, biorące udział we wnikaniu cząstek wirusa HCV do komórki wątroby. *Na podstawie: [90]. Zmodyfikowano.*

1.3. FARMAKOTERAPIA WZW TYPU C

Poznanie biologii (procesu replikacyjnego) wirusa HCV oraz ciągle poszerzanie wiedzy z zakresu funkcjonowania metabolizmu wątrobowego leków skutkuje nowymi doniesieniami z zakresu nowoczesnych form farmakoterapii zakażeń HCV. Jak podaje EASL (*ang. European Association for the Study of the Liver*, Europejskie Stowarzyszenie Badań nad Wątrobą), podstawowym celem leczenia farmakologicznego HCV jest wyleczenie infekcji, poprzez otrzymanie trwałej odpowiedzi wirusologicznej SVR (*ang. sustained virologic response*, trwała odpowiedź wirusologiczna) na takim poziomie, aby cząsteczki HCV RNA nie były już wykrywalne w organizmie po zakończeniu terapii [102].

Aktualnie, ze względu na występowanie dużej ilości groźnych działań niepożądanych, oraz niedostateczną skuteczność leczenia - zaleca się odejście się od tak zwanej "klasycznej terapii WZW C", czyli zastosowania w farmakoterapii pegylowanego interferonu alfa (PegINF α) oraz rybawiryny (RBV). Zostały one zastąpione nowymi lekami o dużej skuteczności, jednak w wielu krajach terapia klasyczna nadal jest stosowana ze względów ekonomicznych [103].

Interferony są naturalnymi komórkowymi białkami, które wykazują różnorodne funkcje, jak na przykład: pośrednie działanie antywirusowe, zahamowanie wzrostu komórek, czy też kontrola apoptozy i regulacja odpowiedzi immunologicznej. Dzięki swoim właściwościom, interferon był przez wiele lat stosowany jako jeden z nielicznych leków, dający chorym na WZW C nadzieję na zmniejszenie wirerii i zahamowanie stanu zapalnego w wątrobie. Aby wzmocnić jego działanie, farmakoterapia z jego udziałem była poszerzana o rybawirynę, analog nukleozydowy, której mechanizm działania nie jest jednoznacznie ustalony, natomiast według dominującej hipotezy pełni ona funkcję modulatora dla układu immunologicznego, a także, jako analog nukleozydu, może powodować przyspieszenie występowania mutacji w regionie NS5B wirusa. Doniesienia naukowe dowodzą, że dwulekowa terapia PegINF i RBV przynosi korzyści terapeutyczne jedynie u części pacjentów. Jest to związane ze zróżnicowaną wrażliwością poszczególnych genotypów wirusa na działanie tych leków, obciążeniem wirusologicznym, czasem trwania terapii, jak również stopniem uszkodzenia wątroby w momencie rozpoczęcia leczenia. Dla genotypu 1. po 48 tygodniach leczenia, można uzyskać SVR u 50% chorych, natomiast u pacjentów z genotypem 2 i 3 nawet 89% SVR. Dane te dotyczą jednak pacjentów z niewielkim udziałem marskości oraz stabilną czynnością wątroby. Skuteczność leczenia, w przypadkach bardziej zaawansowanych jest jednak zdecydowanie mniejsza. Liczne i poważne działania niepożądane rybawiryny i interferonu, a także duża liczba przeciwwskazań (na przykład stan po przeszczepieniu wątroby lub marskość wątroby) bardzo mocno zawężają grupę pacjentów, która może zostać objęta farmakoterapią z wykorzystaniem tych leków. Dodatkowo ważnym czynnikiem mającym wpływ na dwulekowe leczenie INF/RBV jest polimorfizm genu kodującego interleukinę IL-28, która pod wpływem podaży farmakologicznej interferonu, stymuluje produkcję wytwarzanego endogennie interferonu lambda, który z kolei odgrywa dużą rolę w stymulacji odpowiedzi immunologicznej. Niekorzystny układ alleli genu kodującego IL-28, wiąże się z nasileniem aktywnego stanu zapalnego w miększu wątrobowym, słabszą odpowiedzią na INF/RBV, a co za tym idzie zmniejszeniem szans na osiągnięcie SVR.

Z tych względów (dzięki lepszemu poznaniu biologii wirusa i jego cyklu replikacyjnego), prawdziwym przełomem w farmakoterapii HCV było opracowanie w poprzedniej dekadzie nowych leków antywirusowych, obecnie stosowanych w leczeniu WZW C. Nowe leki, oparte na terapii celowanej, działają przez bezpośrednią blokadę funkcji aparatu replikacyjnego wirusa, w konsekwencji czego hamowane jest namnażanie wirusa. Pozwoliło to na przełomowy postęp w farmakoterapii przewlekłych zapaleń wątroby wywołanych przez HCV, powodując zahamowanie procesów niszczenia tkanki wątrobowej oraz umożliwiło całkowitą eradykację wirusa u ogromnej większości pacjentów poddanych leczeniu. Porównanie wybranych DAA (*ang. direct antiviral agents*, bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe) oraz leków starszej generacji przedstawia tabela 2 [103]. Jak można zauważyć, oceniając dane dostępne w tabeli, klasyczne leczenie obarczone jest ryzykiem występowania bardzo poważnych działań niepożądanych, szczególnie w przypadku rybawiryny.

Tabela 2. Najczęściej wykorzystywane klasy leków w leczeniu HCV, ich dawki oraz najczęstsze działania niepożądane. *Na podstawie: [103], zmodyfikowano.*

KLASY LEKÓW	DAWKA DOBOWA	NAJCZĘSTSZE DZIAŁANIA NIEPOŻĄDANE
INHIBITORY NS3 (proteazy) <ul style="list-style-type: none"> ● Asunaprewir ● Boceprewir ● Parytaprewir ● Symeprewir ● Telaprewir ● 	100 mg/d. w 2 dawkach 2400 mg/d. w 3 dawkach 150 mg/d. w 1 dawce 150 mg/d. w 1 dawce 2250 mg/d. w 2 dawkach	Zmęczenie, świąd, ból głowy, wysypka, nudności, niedokrwistość, bezsenność, biegunka, astenia
INHIBITORY NS5B (polimerazy) <ul style="list-style-type: none"> ● Dezabuwir ● Sofosbuwir 	500 mg/d. w 2 dawkach 400 mg/d. w 1 dawce	Zmęczenie, ból głowy, nudności, bezsenność, astenia
INHIBITORY NS5A <ul style="list-style-type: none"> ● Daklataswir ● Ledipaswir ● Ombitaswir 	60 mg/d. w 1 dawce 90 mg/d. w 1 dawce 25 mg/d. w 1 dawce	Zmęczenie, ból głowy, nudności, bezsenność,

<p>INTERFERONY PEGYLOWANE ALFA</p> <ul style="list-style-type: none"> ● PegINFα2a ● PegINFα2b 	<p>180 µg/tydzień 1.5 µg/tydzień</p>	<p>Depresja, bezsenność, biegunka, niedokrwistość, neutropenia, zakażenia wirusowe, tachykardia, duszność, bóle stawów, zapalenie skóry, małopłytkowość, niedoczynność tarczycy, zmniejszenie popędu płciowego</p>
<p>Rybawiryna</p>	<p>1000 lub 1200 mg przy masie ciała 75 kg</p>	<p>Niedokrwistość, neutropenia, zakażenia wirusowe, niedoczynność tarczycy, anoreksja, depresja, bezsenność, myśli samobójcze, bóle głowy, tachykardia, duszność, biegunka, wymioty</p>

Pomimo faktu zidentyfikowania cząstek HCV ponad 30 lat temu, do dzisiaj nie udało się stworzyć szczepionki, która byłaby w stanie skutecznie wspierać ludzki układ immunologiczny w walce z HCV [96]. Główną przyczyną tego faktu jest wysoka zmienność genetyczna wirusa, czyli tak zwany polimorfizm wirusowy HCV, co jest przyczyną wysokiej plastyczności w populacji wirusowej, przez co tworzenie szczepionek i leków wpływających na odpowiedź immunologiczną, skierowaną przeciwko wirusowi, okazuje się być niezwykle trudnym zadaniem [97]. Jednakże obecnie, dzięki poszerzeniu wiedzy na temat poszczególnych komponentów, biorących udział w zakażeniu wirusem HCV, tworzone są nowe leki antywirusowe, o coraz większej skuteczności. Nowe leki, stosowane w politerapii w leczeniu HCV, cechują się zdecydowanie wyższą odpowiedzią organizmu na zastosowane leczenie antywirusowe (SVR – brak obecności HCV RNA w surowicy krwi – stwierdza się nawet u więcej niż 90% pacjentów poddanych terapii) [103]. Mechanizmy działania nowych leków i ich charakterystykę przedstawia tabela 3.

Dzięki trwającym i zakończonym badaniom dotyczącym poszczególnych komponentów, biorących udział w zakażeniu HCV, stosowane są już oraz tworzone nowe skuteczne leki, których mechanizm jest oparty o swoiste, docelowe działanie, co przyczynia się do zmniejszenia występowania komplikacji w trakcie leczenia oraz zwiększa bezpieczeństwo leczenia. Swoisty mechanizm nowych leków oparty jest na rozpoznaniu docelowego działania biologicznego, tak zwanego punktu uchwytu działania leku. Tymi miejscami docelowymi stają się poszczególne komponenty wirusowe i komórkowe (rysunek 30 – rysunek 34). Niektóre z nich charakteryzują się istotną, niezbędną rolą w procesie replikacji wirusa, a ich zablokowanie przez leki skutkuje przerwaniem cyklu replikacyjnego.

Wśród nich wyróżnia się odpowiednie cechy hepatocytów i wirusa HCV na różnych etapach cyklu replikacyjnego [97, 103-121]:

- a) **Przylączenia, wejścia i fuzji wirusa HCV**, gdzie istotną rolę (poza białkami wirusowymi E1 i E2, które odpowiadają za wniknięcie wirusa i często ulegają mutacjom) pełnią tutaj czynniki komórkowe - występujące w postaci stosunkowo dużej liczby receptorów tworzących kompleksy z białkami otoczkowymi wirusa HCV, a nawet pozakomórkowe (które biorą udział w transporcie cząsteczek HCV do hepatocytów).
- b) **Replikacji**: gdzie wiodącą rolę odgrywają czynniki wirusowe, które prawie w całości są zdolne samodzielnie przeprowadzić ten proces.
- c) **Translacji poliproteiny wirusa HCV**, gdzie wirusowy aparat translacyjny jest wszechstronnie przystosowany, wyposażony w narzędzia molekularne do korzystania z dostępnych w komórce enzymów, białek, kwasów nukleinowych (podjednostek rybosomowych, tRNA itp.) w celu odpowiedniego tworzenia i obróbki powielanych, nowych struktur.
- d) **Obróbki potranslacyjnej**, gdzie następuje proces cięcia polipeptydu na mniejsze fragmenty, pełniące ściśle określone funkcje z ważnym udziałem czynników komórkowych (jak peptydaza sygnałowa, czy też peptydaza odcinająca sekwencję sygnałową)
- e) **Składania i uwalniania wirionu**: etapu, w trakcie którego są wykorzystywane błony retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego.

PRZYŁĄCZENIE WIRUSA, WEJŚCIE I FUZJA

CZYNNIKI KOMÓRKOWE:

- CD 81,
- SR-BI,
- klaudyna 1,
- DC SIGN (CD 209) * ,
- L SIGN (CD 209L)* ,
- receptor LDL,
- receptor asialoglikoproteinowy (ASGP-R)

CZYNNIKI WIRUSOWE:

- E1,
- E2

* - w hepatocytach nie zaobserwowano występowania tych czynników, jednakże badania dowodzą, że biorą one udział w transporcie cząsteczek HCV do hepatocytów

Rysunek 30. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesie przyłączenia, wejścia i fuzji HCV do komórki hepatocytu. *Za: [90]. Opracowanie własne.*

REPLIKACJA

CZYNNIKI KOMÓRKOWE:

- fragmenty błony komórkowej,
- białko hVAP-A,
- cyklofilina B,
- FBL2,
- białko PTB,
- mikroRNA

CZYNNIKI WIRUSOWE:

- zależna od RNA polimeraza,
- NS5B,
- NS5A,
- NS3 NTPaza,
- region X 3'UTR,
- domena 1 5'UTR

Rysunek 31. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach replikacyjnych. *Za: [90]. Opracowanie własne.*

TRANSLACJA POLIPROTEINY WIRUSA HCV

CZYNNIKI KOMÓRKOWE:

- podjednostki rybosomowe,
- eIF2,
- eIF3,
- tRNA,
- białko PTB,
- hnRNPL
- autoantygen La,
- białko 2 wiążące Poli(rc),
- białko 1 zasocjowane z NS1

CZYNNIKI WIRUSOWE:

- IRES,
- domena 1 5'UTR,
- otwarta ramka odczytu HCV,
- 3'UTR,
- NS4A,
- NS4B

Rysunek 32. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach translacyjnych.

Za: [90]. Opracowanie własne.

OBRÓBKA POTRANSLACYJNA

CZYNNIKI KOMÓRKOWE:

- peptydaza sygnałowa,
- peptydaza odcinająca sekwencję sygnałową

CZYNNIKI WIRUSOWE:

- zależna od jonów cynku metaloproteinaza NS2
- NS3/NS4 proteaza sygnałowa

Rysunek 33. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach obróbki potranskrypcyjnej. *Za: [90]. Opracowanie własne.*

SKŁADANIE I UWALNIANIE WIRIONU

CZYNNIKI KOMÓRKOWE:

- błony retikulum endoplazmatycznego,
- aparat Golgiego

CZYNNIKI WIRUSOWE:

- białko C,
- E1,
- E2,
- genom RNA wirusa

Rysunek 34. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach składania i uwalniania wirionu. *Za: [90]. Opracowanie własne.*

W wyniku szczegółowych badań dotyczących cyklu replikacyjnego wirusa HCV, pojawiły się różne strategie leczenia antywirusowego. Choć część z nich nie przeszła wymagających prób klinicznych (tabela 3), wyznaczyły one nowe drogi w dziedzinie tworzenia leków antywirusowych. Wcześniej, gdy jedynym dostępnym leczeniem było zastosowanie INF/RBV, głównym problemem farmakoterapii był brak lub niska odpowiedź na leczenie chorych z genotypem pierwszym WZW C. Nowe leki DAA, były przede wszystkim dedykowane tej grupie pacjentów. Pierwszymi z takich leków były, wprowadzone w 2011 roku, boceprewir i telaprewir, które są swoistymi inhibitorami proteazy NS3/NS4A. Były one stosowane w potrójnej terapii z INF/RBV. Ich zastosowanie u pacjentów bez marskości wątroby zaowocowało wzrostem SVR do 83%. Jednakże ten rodzaj terapii nie sprawdzał się u osób, które wcześniej były poddawane terapii INF/RBV oraz niósł ze sobą szereg działań niepożądanych. Co więcej, u osób z niektórymi wariantami genu IL-28, SVR nie przekraczał 50%. Ocenia się, że występowanie działań niepożądanych w głównej mierze było spowodowane koniecznością łączenia inhibitorów proteazy z klasycznymi lekami, szczególnie rybawiryną. Dodatkową wadą była konieczność przyjmowania dużej liczby dawek leku (kilka razy dziennie). Same inhibitory proteazy (tabela 2) także mogą być przyczyną występowania niekorzystnych działań niepożądanych, np.: w postaci zmian skórnych, czy niedokrwistości (ze względu na znaczny spadek stężenia hemoglobiny w erytrocytach). Z czasem okazało się również, że takie leczenie wiąże się także z rozwojem szybkiej oporności wirusa HCV na działanie boceprewiru oraz telaprewiru. Pierwsze niepowodzenia w działaniu związków bezpośrednio hamujących replikację HCV, zdeterminowały badaczy

do poszukiwania kolejnych związków o mniej toksycznym działaniu i większym bezpieczeństwie zastosowania w leczeniu [108-111].

Po kolejnych badaniach klinicznych, wprowadzono na rynek drugą generację inhibitorów proteazy NS3/4A – simeprewir, który został dopuszczony do leczenia zakażonych na HCV z genotypem 1 w połączeniu z klasycznym leczeniem INF/RBV. Skuteczność leczenia była podobna do wcześniej opisanych terapii z wykorzystaniem trzech leków, jednakże była związana z mniej nasilonymi (lecz podobnymi) działaniami niepożądanymi oraz faktem wykluczenia z leczenia około 25% pacjentów, którzy charakteryzowali się występowaniem naturalnego polimorfizmu Q80K w obrębie kodonów NS3, co skutkowało obniżeniem wrażliwości na leczenie trójskładnikowe. W podobny sposób warunkują skuteczność leczenia polimorfizmy L31M i Y93H w NS5A w genotypie 1, a obecność wirusa o genotypie typu 3 uznawana jest za najtrudniejszą do wyleczenia [111].

Kolejnym postępowaniem w terapii farmakologicznej HCV, było zastosowanie simeprewiru bez użycia INF/RBV, ale z równoległym włączeniem sofosbuwiru. Połączenie leków o różnych punktach uchwytu – inhibitora wirusowej proteazy NS3 i polimerazy NS5B znacząco zwiększyło skuteczność terapii. Dodatkowym atutem tych leków była możliwość ich zastosowania w całkowicie nowej docelowej grupie pacjentów (pacjenci o genotypie 1 HCV, zarówno przed jak i po przeszczepieniu wątroby, jak również z występującym polimorfizmem Q80K). Zastosowania tego rodzaju terapii celowanej, umożliwiło osiągnięcie SVR nawet na poziomie 92% [108, 111]].

Działanie sofosbuwiru opiera się na niekompetencyjnej inhibicji polimerazy NS5B (której sekwencja aminokwasów praktycznie nie ulega zmianom w każdej nowo powielonej cząsteczce wirusa), dzięki czemu hamowana jest proliferacja HCV w krytycznym momencie, niezależnie od rodzaju genotypu wirusa HCV. Zasada działania leku polega na przyłączeniu się do centrum aktywnego polimerazy NS5B, funkcjonalnym zahamowaniu potencjału replikacyjnego wirusa, co ogranicza istotnie możliwość rozwoju oporności wirusa, z tego względu, że region kodujący polimerazę NS5 nie jest tak zmienny, jak chociażby region kodujący białka otoczkowe E1 i E2. Lek ten podawany w różnych kombinacjach, z innymi lekami antywirusowymi, jednak już bez zastosowania interferonu, przyczynił się do podniesienia skuteczności leczenia antywirusowego, także u pacjentów ze zdekompensowaną funkcją wątroby [112].

Z czasem zaczęto wdrażać leczenie nowymi substancjami, rozszerzając możliwości farmakoterapii o pozostałe genotypy HCV. Druga generacja inhibitorów NS3/4A, obejmująca nowe leki DAA: perytaprewir w skojarzeniu z obitaswirem, dazabuwirem, jak również rytonawirem (inhibitorem CYP3A4, dzięki któremu zahamowany jest metabolizm i zwiększa się stężenie leków antywirusowych w osoczu) umożliwiła leczenie pacjentów także z genotypem 4 HCV [112].

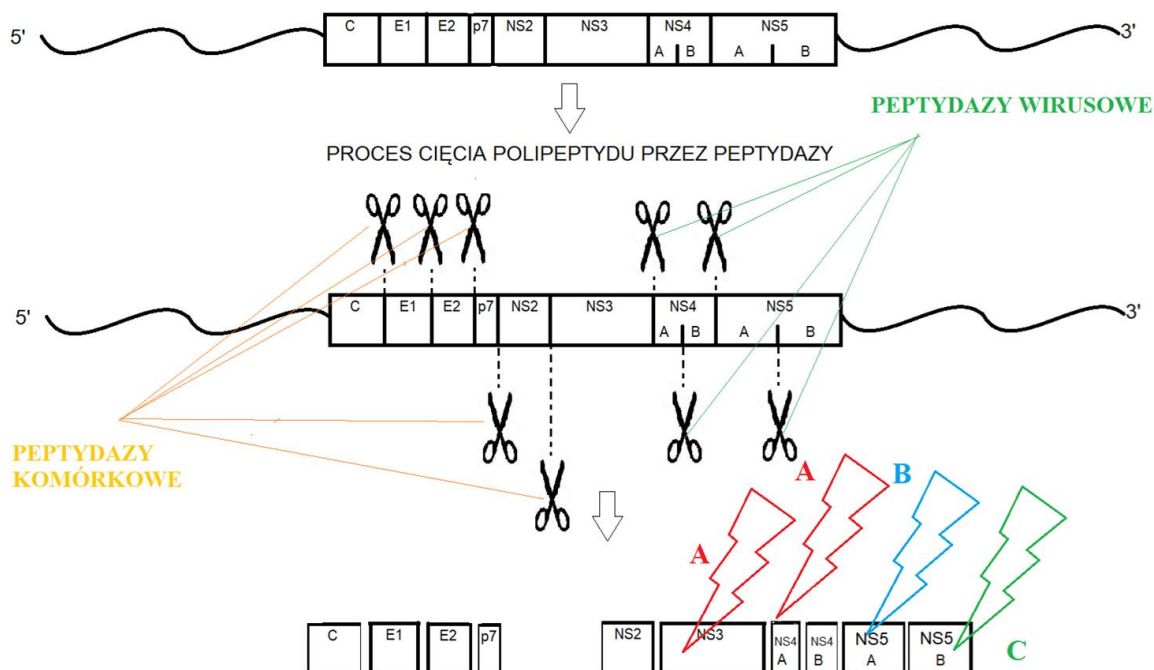
Postępująca marskość wątroby ogranicza wymianę substancji między płynącą krwią, a komórkami wątroby, co skutkuje mniejszym wchłanianiem dawki leku do tkanki wątrobowej, która w przypadku leków przeciw HCV stanowi ich docelowe miejsce działania. Kolejnym ważnym czynnikiem, jest ograniczenie prawidłowego działania leków przez zapalenie i włóknienie czynnego miąższu wątrobowego, gdzie przebiega metabolizm leków antywirusowych. Fakty, te potwierdzają lekarze specjaliści w zakresie hepatologii, którzy wyraźnie wskazują, że w trakcie leczenia WZW C, na toksyczność leczenia oraz SVR ma wpływ stan zaawansowania zwłóknienia narządu [112]. Stan zwłóknienia narządu może więc znacząco wpływać na szybkość metabolizmu i eliminację podawanego leku antywirusowego, przyczyniając się do jego akumulacji w organizmie. Na skuteczność działania i ryzyko działań niepożądanych wpływ ma nie tylko sama dostępność leku do miejsca działania, związana z ograniczonym przepływem krwi, ale także szybkość jego metabolizmu, co w przypadku wielu nowych leków przeciwwirusowych wiąże się z aktywnością enzymów układu CYP450. Dobrym przykładem takiego oddziaływania jest metabolizm symeprewiru (tabela 3), który w tych procesach jest substratem dla CYP3A oraz inhibitorem dla CYP3A4 i CYP1A2. Blokada metabolizmu wątrobowego leku prowadzi zatem do akumulacji tego związku w organizmie. Innym przykładem mogą być: gazoprewir i elbaswir, które są częściowo metabolizowane w procesach utleniania przez CYP3A4. Enzym ten odpowiedzialny jest za metabolizm szerokiej grupy leków, w związku z czym istnieje ryzyko występowania różnego rodzaju interakcji między stosowanymi lekami, bądź ksenobiotykami, które są silnymi induktorami CYP3A4 [101-102]. Należy przy tym wspomnieć, że pacjenci w przebiegu marskości wywołanej HCV (skala Childa-Pugha B i C) zwykle nie są uwzględniani jako kandydaci do badań klinicznych II i III fazy [78, 113, 144, 145]. Kolejnym ważnym czynnikiem warunkującym działanie leków przeciwwirusowych jest droga eliminacji związków z organizmu. Prawidłowy przebieg II fazy metabolizmu leków, z udziałem UGT1A1, UGT1A3, warunkuje poprawną i wydajną eliminację związków z organizmu i zabezpiecza przed ich akumulacją oraz nasileniem występowania działań niepożądanych, dlatego też związki

o podobnej drodze eliminacji powinny być dobierane w terapii skojarzonej ze szczególną uwagą, jak chociażby poprzez umiejętne dostosowanie dawek z zastosowaniem np.: perytaprewiru (inhibitor proteazy), ombitaswiru (interferencja z białkami błonowymi, hamowanie replikacji RNA) idazabuwiru (inhibitor wirusowej polimerazy RNA) [33]. Badanie ekspresji genów kodujących enzymy I i II fazy układu detoksykacyjnego oraz zawartości poszczególnych białek enzymatycznych podjęte w niniejszej pracy może więc mieć znaczenie nie tylko ze względu na zmiany w metabolizmie leków przyjmowanych przez pacjentów z WZW C z powodu innych chorób, ale także ze względu na możliwość przyszłej indywidualizacji lekami przeciwwirusowymi.

Tabela 3. Nowe leki stosowane w leczeniu HCV, z uwzględnieniem miejsca docelowego działania oraz przebiegu metabolizmu. *Na podstawie [118-146]:*

MIEJSCE DOCELOWE (CZYNNIK WIRUSOWY)	NAZWA LEKU	METABOLIZM
INHIBITORY PROTEAZ: NS3/4A BLOKADA POWSTAWANIA/CIĘCIA BIAŁEK WIRUSOWYCH,	BOCEPREWIR	Substrat dla: CYP3A4/5, Inhibitor dla: CYP3A, Induktor dla: NA
	TELAPREWIR	Substrat dla: CYP3A4/5, Silny inhibitor dla: CYP3A, Induktor dla: NA
	SIMEPREWIR	Substrat dla: CYP3A, Inhibitor dla: CYP3A4 i CYP1A2, Induktor dla: NA
	ASUNOPREWIR	Substrat dla: CYP3A, Inhibitor dla: CYP2D6, Induktor dla: CYP3A4
	PARITAPREWIR	Substrat dla: CYP3A4/5 Inhibitor dla: NA Induktor dla: NA
	GRAZOPREWIR	Substrat dla: CYP3A, Inhibitor dla: CYP3A

		Induktor dla: NA
INHIBITORY NS5A: INTERFERENCJA Z BIAŁKAMI BŁONOWYMI, HAMOWANIE REPLIKACJI RNA WIRUSA	DECLATASWIR	Substrat dla: CYP3A, Inhibitor dla: CYP3A Induktor dla: NA
	LEDIPASWIR	MINIMALNIE METABOLIZOWANY
	OMBITASWIR	Substrat dla: NA, Inhibitor dla: NA, Induktor dla: NA
	ELBASWIR	Substrat dla: CYP3A, Inhibitor dla: NA, Induktor dla: NA
	VELPATASWIR	Substrat dla: CYP2B6, CYP2C8, CYP3A4, Inhibitor dla: NA, Induktor dla: NA
INHIBITORY POLIMERAZY RNA: NS5B BLOKADA REPLIKACJI RNA WIRUSA	SOFOSBUWIR	PROLEK
	DASABUWIR	Substrat dla: CYP3A, CYP2C8, CYP2B6, Inhibitor dla: NA, Induktor dla: NA



Rysunek 35. Punkty uchwytu DAA: A) **inhibitory NS3/NS4 proteaz**: zaburzą cięcie poliproteiny wirusowej (hamują replikację, obróbkę potranslacyjną białek), B) **inhibitory NS5A** (zaburzą pracę głównego składnika kompleksu replikacyjnego, ważnego w składaniu wirionów i interakcjach z metabolizmem komórek gospodarza), C) **inhibitory polimerazy RNA NS5B** (zaburzą pracę polimerazy RNA zależnej od RNA wirusa HCV, hamując proces replikacji wirusa HCV). Za: [114]. Zmodyfikowano.

Na przestrzeni ostatnich lat, oprócz terapii opartych na bezpośrednim działaniu antywirusowym, prowadzono także badania nowych substancji leczniczych, których celem działania są czynniki komórkowe - tzw. HTAs (z ang. *Host Targeting Agents*). Leki te były testowane na różnych etapach klinicznych, jednak ze względu na dużą skuteczność zarejestrowanych inhibitorów NS3, NS5A i NS5B ich wprowadzenie na rynek jest obecnie mało prawdopodobne (tabela 4)[114].

Tabela 4. Przedstawiciele kandydatów na leki z grupy HTA. Za: [118-138, 143, 144-146].

NAZWA PREPARATU	MIEJSCE DOCELOWE DZIAŁANIA (CZYNNIK KOMÓRKOWY)	ETAP BADAŃ KLINICZNYCH	ETAP CYKLU REPLIKACYJNEGO HCV
AVASIMIBE	Acetylotransferaza cholesterolowa (ACAT)	FAZA PRZEDKLINICZNA	Uwalnianie i składanie
SUNITINIB	AAK1	FAZA PRZEDKLINICZNA	Uwalnianie i składanie
ANTI-CLDN1	RECEPTOR CLAUDINY-1	FAZA PRZEDKLINICZNA	Przyłączanie i wnikanie
ERLOTINIB	KINAZA CYKLINOWA (GAK)	FAZA PRZEDKLINICZNA	Uwalnianie i składanie
IZOTHIAZOLO [5,4-B] PYRIDYNE	KINAZA CYKLINOWA (GAK)	FAZA PRZEDKLINICZNA	Uwalnianie i składanie
ALISPORWIR	CYKLOFILINA A	FAZA III (ZATRZYMANA)	REPLIKACJA RNA
NIM811	CYKLOFILINA A	FAZA IIa	REPLIKACJA RNA
SCY635	CYKLOFILINA A	FAZA IIa	REPLIKACJA RNA
MIRAWIRSEN	miRNA-122	FAZA IIa	REPLIKACJA RNA

2. CEL PRACY

Celem badań były:

- ocena profilu ekspresji mRNA wybranych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem leków w bioptatach wątroby pobranych od pacjentów z niewydolnością tego organu w przebiegu HCV oraz w grupie kontrolnej,
- ilościowe określenie zawartości białek wybranych enzymów CYP450 i UGT w bioptatach wątroby u pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV oraz w grupie kontrolnej,
- określenie korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka,
- analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków na poziomie mRNA i białka.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1. Materiał:

Materiał do badań: oceny profilu ekspresji mRNA, ilościowej analizy zawartości białek, analizy korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka, analizy związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków na poziomie mRNA i białka, wybranych enzymów CYP450 i UGT, stanowiły fragmenty tkanki wątrobowej, pobrane na Oddziale Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej oraz Chirurgii Transplantacyjnej Szpitala Wojewódzkiego w Szczecinie:

- a) jako próby kontrolne wykorzystano biopaty wątroby pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem okrężnicy z przerzutami do wątroby, z miejsca oddalonego o co najmniej 5 cm od guza. Tkanki pobrano podczas operacji resekcji guza od pacjentów z województwa zachodniopomorskiego, w wieku 63 ± 10 lat, 11 mężczyzn i 9 kobiet. Pobrane tkanki nie wykazywały cech patologicznych, co potwierdzono badaniem histologicznym.
- b) próbami badanymi (n=58) były fragmenty tkanki miąższowej wątroby pobranej od pacjentów chorych na zapalenie wątroby typu C (HCV), zakwalifikowanych do przeszczepienia tego organu. Próby tkanki wątroby pobrano podczas operacji przeszczepienia wątroby z narządu, bezpośrednio po wycięciu. Stopień zaawansowania czynności wątroby klasyfikowano według skali Childa-Pugha. Charakterystykę dawców pobranych tkanek przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka próby badanej i kontrolnej. *W tabeli przedstawiono charakterystykę osób, od których pochodziły biopaty wątroby wykorzystane w analizie.*

Parametr/choroba	Kontrola n=20	HCV n=58	Ch-P A n=30	Ch-P B n=21	Ch-P C n=7
Płeć [M/K]	11/9	30/28	16/14	11/10	3/4
Wiek [lata]	63 ± 10	56 ± 7	57 ± 7	55 ± 8	52 ± 9
Bilirubina całkowita [mg/dl]	0.59 ± 0.25	1.75 ± 1.26	1.03 ± 0.57	2.05 ± 0.84	3.62 ± 1.78
Albumina [g/dl]	3.89 ± 0.38	3.38 ± 0.57	3.67 ± 0.49	3.23 ± 0.45	2.71 ± 0.40
INR	1.14 ± 0.21	1.30 ± 0.28	1.20 ± 0.22	1.29 ± 0.17	1.71 ± 0.36

Dla pacjentów stanowiących grupę kontrolną dostępne były pełne informacje o przyjmowanych przez nich lekach, tj. jeden pacjent był leczony bisoprololem, furosemidem i tamsulozyną (nadciśnienie i przerost gruczołu krokowego), jeden był leczony beprydylem (choroba niedokrwienna serca oporna na inne leki), a kolejny był leczony amlodypiną (nadciśnienie tętnicze). Żaden z tych leków nie jest znany jako silny regulator enzymów CYP lub UGT.

Próby wątroby pacjentów z HCV zostały zebrane w latach 2007-2019, a standardy leczenia HCV były w tym okresie kilkakrotnie modyfikowane, co stanowi pewne ograniczenie niniejszego badania. Ograniczeniem badania była również duża częstość występowania chorób współistniejących. Dla potrzeb niniejszej pracy, do badania wybrano próby od pacjentów bez chorób współistniejących (oprócz prób opisanych powyżej), co ograniczyło liczbę prób wykorzystanych w pracy.

Próby tkanek pobierano z wątroby (kontrolnej i patologicznej) od pacjentów, którzy podczas operacji poddani byli standardowemu znieczuleniu ogólnemu (propofol, sewofluran, roxonium, fentanyl), nie później niż 15 minut po zatrzymaniu przepływu krwi w obrębie organu. Próby wątroby natychmiast zamrożono w ciekłym azocie w celu analizy białka lub zabezpieczono przed degradacją w roztworze RNAlater (Applied Biosystems, Darmstadt, Niemcy) do analizy RNA, a następnie przechowywano w -70 °C. Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (BN-001/11/07-A). Od wszystkich uczestników badania uzyskano świadomą zgodę. Do badań genetycznych wykorzystano próby mrożone.

3.2. Izolacja mRNA oraz ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time RT-PCR):

a) Całkowite RNA od każdego pacjenta wyizolowano z 25 mg tkanki wątrobowej przy użyciu zestawu Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Izolację przeprowadzono wg. protokołu dołączonego do zestawu, z wykorzystaniem metody kolumnkowej:

- Zestaw do izolacji RNA Direct-zol RNA MiniPrep, obejmował: odczynnik lizujący TRI-Reagent, roztwór płuczający RNA PreWash Buffer, roztwór płuczający RNA Wash

Buffer, wodę wolną od nukleaz RNase-Free Water, kolumnienki Zymo-Spin, probówki do płukania kolumnienek (bez wieczka).

- Dodatkowe materiały stanowiły: etanol cz.d.a, probówki 2 ml, probówki wolne od nukleaz 1.5ml, rękawice ochronne, płyn dezaktywujący RNAzy (RNase Zap), końcówki do pipet.
- Potrzebnymi urządzeniami były: wirówka laboratoryjna, homogenizator typu rotor-stator z wymiennymi końcówkami, pipety, spektrofotometr.

Przebieg procedury:

1. Przygotowano i podpisano probówkę 2.0 ml dla każdej próby badanej.
2. Wyjęto próbę tkanki wątrobowej z roztworu RNA later, odsączono na gazie, przełożono do podpisanej probówki 2.0 ml.
3. Dodano 0.5 mL TRI reagent.
4. Zainstalowano nową końcówkę na homogenizatorze. Homogenizowano do całkowitego rozdrobnienia próby.
5. Zwirowano próbę: 12,000 x g, 1 min. Przełożono supernatant - 400 ml do nowej probówki 2.0 ml.
6. Dodano równą objętość etanolu cz.d.a. (tyle samo ile było próby), wymieszano na wortexie.
7. Umieszczono kolumnienkę z zestawu na probówce z zestawu (bez wieczka).
8. Przeniesiono całość na kolumnienkę, kolumnienkę zamknięto.
9. Zwirowano próbę: 12,000 x g, 1 min. Przełożono kolumnienkę na nową probówkę z zestawu.
10. I płukanie: Na kolumnę naniesiono 400 µl dla roztworu Direct-zol™ RNA PreWash, zamknięto próbówkę.
11. Zwirowano próbę: 12,000 x g, 1 min. Wylano przesącz.

12. II płukanie: Na kolumnę naniesiono 400 μ l dla roztworu Direct-zol™ RNA PreWash, zamknięto próbkę..

13. Zwirowano próbkę: 12,000 x g, 1 min. Wylano przesącz.

14. III płukanie: Na kolumnę naniesiono 700 μ l dla roztworu RNA Wash Buffer, zamknięto próbkę..

15. Zwirowano próbkę: 12,000 x g, 1 min. Wylano przesącz.

16. Zwirowano próbkę: 12,000 x g, 2 min.

17. Przełożono kolumnkę na próbkę 1.5 mL, wolną od nukleaz. Na kolumnę naniesiono 30 μ L wody wolnej od nukleaz.

18. Zwirowano próbkę: 16,000 x g, 1 min. Wyrzucono kolumnę. Zamknięto próbkę.

19. Zmierzono stężenie RNA przy pomocy spektrofotometru NanoDrop.

20. Po pomiarze przechowywano próby do dalszej analizy w temp. -70°C.

b) Stężenie i czystość RNA oceniano przy użyciu spektrofotometru DS-11 FX (Denovix, Wilmington, DE, USA), umożliwiającego pomiar prób w mikroobjętościach. Czystość RNA szacowano na podstawie oceny absorbancji przy długościach fali 260/280 nm. Do dalszych badań wykorzystano próby, w których stosunek pomiaru przy długościach fali 260/280 nm był większy lub równy 1.8 i nie większy, niż 2.0.

c) cDNA przygotowano przy użyciu zestawu SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), z 500 ng całkowitego RNA na 20 μ l objętości reakcyjnej zgodnie z procedurą producenta.

- Zestaw do odwrotnej transkrypcji High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zawierał: odwrotną transkryptazę MultiScribe (50U/ μ l), bufor reakcyjny (10x RT Buffer), mieszaninę deoksynukleotydów (25x dNTP Mix, 100 mM), mieszaninę starterów (10x RT Random Primers), inhibitor RNAz (RNase Inhibitor, 20U/ μ l).
- Dodatkowe materiały stanowiły: woda wolna od nukleaz, próbki 0.5 ml, próbki reakcyjne 0.2 ml, rękawice ochronne, płyn dezynfekcyjny, końcówki do pipet, płyn dezaktywujący RNAzy (RNase Zap).

- Potrzebnymi urządzeniami były: pipety, vortex, podręczne mikrowirówki, termocykler.

Przebieg procedury:

1. Próby RNA wyciągnięto z zamrażarki, wstawiono do lodówki, aby odmarzły. Odczynniki (oprócz enzymu - odwrotnej transkryptazy) wyciągnięto z zamrażarki i rozmrożono na lodzie i ustawiono w statywie chłodzącym).
2. W opisanych probówkach 0.2ml (połączonych w tzw. paski - *strips*), umieszczonych na lodzie lub statywie chłodzącym, przygotowano roztwory RNA o równych stężeniach dla wszystkich prób: tak aby w objętości 10 μ l było 1000 ng całkowitego RNA.
3. W próbówce 1 ml umieszczonej na statywie chłodzącym przygotowano 2 x mieszaninę reakcyjną (10 μ l na każdą badaną próbkę), w skład której wchodziły: 2 μ l 10x RT Buffer, 0,8 μ l 25x dNTP Mix (100mM), 2 μ l 10x RT Random Primers, 1 μ l MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 μ l RNase inhibitor, 3.2 μ l wody wolnej od nukleaz. Po dodaniu składników, wymieszano, zwirowano i pozostawiono na lodzie.
4. Do każdej próby RNA dodano 10 μ l wcześniej przygotowanej mieszaniny reakcyjnej.
5. Zamknięto probówki, wymieszano na wortexie, zwirowano, umieszczono na lodzie.
6. Zaprogramowano termocykler Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 na następujący program: 25°C-10min, 37°C-120 min, 85°C - 5 min, 4°C - ∞
7. Umieszczono próby w termocyklerze, zamknięto pokrywę grzejną, uruchomiono program

d) Ekspresję genów badano w dwóch powtórzeniach przy użyciu mieszaniny reakcyjnej TaqMan Fast Advanced Master Mix i walidowanych przez producenta zestawów TaqMan assays (tabela 6) za pomocą urządzenia ViiA 7 Real-Time PCR (Life Technologies, Waltham, MA, USA). Wartości progowe dla każdego genu były ustawiane ręcznie i rejestrowano średnie wartości C_T (liczba cykli, po których fluorescencja sondy przekraczała wartość progową). Względą ekspresję mRNA obliczano metodą $2^{-\Delta CT}$: ekspresję genu badanego normalizowano do średniej wartości ekspresji uzyskanej dla genów referencyjnych (ang. *house-keeping genes*: *GAPDH* (Hs999905_m1), *HMBS* (Hs00609297_m1), *PPIA* (Hs04194521_s1), *RPLP0* (Hs999902_m1), *RPS9* (Hs02339424_g) oraz metodą $2^{-\Delta\Delta CT}$, w której dodatkowo normalizowano ekspresję genów w próbach z grupy badanej do średniej wartości ekspresji tego genu dla grupy kontrolnej. Objętość reakcyjna wynosiła 20 μ l. Profil temperaturowy reakcji

zaprogramowano następująco: 2 min 50 °C, wstępna denaturacja 10 min 95°, 40 cykli: 15 s 95°C + 1 min 60°C.

Tabela 6. Lista zestawów startery + sonda TaqMan użytych w badaniu. Podano Assay ID - identyfikator zestawu podany przez producenta.

SYMBOL GENU	LOKALIZACJA CHROMOSOMOWA	TaqMaN Assay ID
<i>CYP1A1</i>	Chr.15: 74719542 - 74725610	Hs00153120_m1
<i>CYP1A2</i>	Chr.15: 74748843 - 74756600	Hs00167927_m1
<i>CYP2C8</i>	Chr.19: 53431974 - 53458261	Hs023802383691
<i>CYP2C19</i>	Chr.10: 94762681 - 94853205	Hs00426380_m1
<i>CYP2D6</i>	Chr.22: 42125531 - 42130881	Hs00164385_m1
<i>CYP2E1</i>	Chr.10: 133527363 - 133539116	Hs00559367_m1
<i>CYP3A4</i>	Chr.7: 99756960 - 99784188	Hs00604506_m1
<i>CYP3A5</i>	Chr.7: 99648189 - 99680026	Hs01070905_m1
<i>UGT1A1</i>	Chr.2: 233760273 - 233773299	Hs02511055_s1
<i>UGT1A3</i>	Chr.2: 233729127 - 233773299	Hs04194492_g1
<i>UGT2B7</i>	Chr.4: 69051264 - 69112987	Hs00426592_m1
<i>UGT2B15</i>	Chr.4: 68646597 - 68670776	Hs00870076_s1
<i>CYP2C9</i>	Chr.10: 94905867 - 94989395	Hs02383631_s1

3.3. Analiza ilościowa białka z zastosowaniem LC–MC/MS

Tkanki umieszczone w ciekłym azocie rozbijano mechanicznie za pomocą móżdziejza ze stali nierdzewnej. Około 40 mg sproszkowanej tkanki z każdej próbki po zważeniu poddano lizie z użyciem 1 ml roztworu 0,2% SDS i 5 mM EDTA zawierającego inhibitory proteazy III (w stężeniu 5 µl/ml) (Merck, Darmstadt, Niemcy) przez 30 minut w temperaturze 4°C na wytrząsarce zaprogramowanej na pracę z szybkością 40 obr/min (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Niemcy). Całkowitą zawartość białka w lizatach tkankowych określono za pomocą testu kwasu bicornoninowego (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), zgodnie z instrukcjami producenta. 100 µg każdej próbki poddano dalszej obróbce przy użyciu metody FASP (ang. *filter-assisted sample preparation*) w oparciu o opracowany

protokół. Metoda pozwala na uzyskanie mieszaniny peptydów, które mogą zostać następnie użyte do ilościowego pomiaru białek enzymów metabolizujących leki z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas. Ilość białka dziesięciu enzymów CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) i czterech UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 i UGT2B15) została określona za pomocą LC –MS/MS. Końcowy pomiar spektrometryczny ilości białka przeprowadzono w Center of Drug Absorption and Transport (C_DAT) Uniwersytetu w Greifswaldzie.

3.3.1. Procedura FASP

Trawienie białka trypsyną – FASP:

Wszystkie wirowania prowadzono przy 14 000 g w temperaturze pokojowej, aby uniknąć uszkodzenia kolumny. Jeżeli więcej niż 20 µL płynu pozostawało po etapie wirowania (wyraźnie widoczny ruch roztworu podczas przechylania próbki do kąta 45 °C), powtarzano wirowanie, ew. wydłużano czasy następnych wirowań. Wszystkie próby, które były porównywane ze sobą w badaniu były przygotowane z użyciem tej samej partii materiałów i odczynników.

Potrzebne materiały:

- Filtry VIVACON 500 (10K), Sartorius (Niemcy)
- 1% FA (roztwór wodny kwasu mrówkowego w H₂O dest.)
- Blok grzejny 56 °C i inkubator 37 °C
- Oprócz standardowych plastików – końcówki i probówki typu LoBind (mniejsza adhezja białka), wszędzie tam, gdzie plastik styka się z próbą badaną (przenoszenie, umieszczanie próby)
- **Bufor UT** (8M mocznik + 2M tiomocznik) – przygotowano 1 raz na całą planowaną partię prób. 1,92 g mocznik + 0,61 g tiomocznik aqua dest. ad 4 mL (potrzebne ok. 200 µL na próbkę, podzielono dla całej puli badanych prób, następnie podzielono na porcje potrzebne przy dziennej izolacji i zamrożono w -20 °C), Sigma-Aldrich (Niemcy).
- **Bufor DTT** (8 mM ditiotretitol) – przygotowano świeży każdego dnia roboczego. Odważono 10,8 mg DTT (np. w probówce 1.5 mL), rozpuszczono w 9 mL buforu

mocznikowego 8M (np. w próbówce 15 mL; dokładnie przepłukano probówkę z nawązką – przeniesiono DTT ilościowo), Sigma-Aldrich (Niemcy).

- **Bufor IAA** (50 mM jodoacetamid) – przygotowano świeży każdego dnia roboczego. Odważono 46 mg IAA, rozpuszczono w 5 mL buforu mocznikowego 8M, Sigma-Aldrich (Niemcy).
- **Roztwór AHC** (65 mM wodorowęglan amonu) – przygotowano świeży każdego dnia roboczego. Odważono 50 mg AHC, rozpuścić w 10 mL wody destylowanej.
- **Roztwór trypsyny** – przygotowano świeży każdego dnia roboczego, około 15 minut przed użyciem; 1 µg trypsyny na 100 µg białka; TRIPSIN SEQUENCING GRADE – Promega (Stany Zjednoczone) V5113 0,5 µg/ µL. Trypsyna 2 µL + AHC 65mM 30,8 µL + H₂O redest. 67,2 µL na każdą próbę; przechowywano w lodówce do czasu dodania na kolumnę.
- **10% TFA** (10% roztwór kwasu trójfluorooctowego w wodzie destylowanej), Sigma-Aldrich (Niemcy).

Przebieg procedury:

1. Ogrzano bufor mocznikowy i bufor UT do temperatury pokojowej (mocznik w tym stężeniu została się na lodzie czy w lodówce)
2. Przygotowano kolumny Vivacon na próbkach odbieralnikowych. Na każdy filtr nałożono 100 µL 1% FA. Zwirować 14 000g 15 min.
3. Do próbki 0,5 mL LoBind z lizatem próby badanej (różna objętość, 100 µg białka) dodano buforu UT do końcowej objętości 200 µL. Wymieszano przez aspirację.
4. Naniesiono całość próby 200 µL na kolumnę i zwirowano 25-30 min.
5. Naniesiono na kolumnę 200 µL buforu mocznikowego i zwirowano 25-30 min.
6. Wylano płyn z próbki odbieralnikowej, umieszczono ponownie kolumnę na próbówce.
7. Naniesiono na kolumnę 100 µL DTT, delikatnie wymieszano na wytrząsarce i inkubowano 15 min w temperaturze 56 °C na bloku grzejnym. Włączono opcję wytrząsania 300-400 rpm.
8. Zwirowano próbę 15-20 min. .

9. Naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-20 min.
10. Powtórnie naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-25 min.
11. Naniesiono na kolumnę 100 μL IAA delikatnie wymieszano na wytrząsarce i inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła.
12. Zwirowano próbę 15-25 min.
13. Naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-25 min.
14. Powtórnie naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-25 min.
15. Wylano płyn z próbówki odbieralnikowej. Umieszczono ponownie kolumnę na próbówce.
16. Naniesiono na kolumnę 100 μL DTT, delikatnie wymieszano na wytrząsarce i inkubowano 15 min. w temperaturze 56 °C na bloku grzejnym.
17. Zważono próbówki 1,5 mL – po jednej na każdą próbę – potrzebne pod koniec dnia roboczego - w celu późniejszego dokładnego wyznaczenia masy uzyskanego eluatu.
18. Zwirowano próbę 15-25 min.
19. Naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-25 min.
20. Powtórnie naniesiono na kolumnę 100 μL buforu mocznikowego i zwirowano 15-25 min.
21. Naniesiono na kolumnę 100 μL AHL i zwirowano 15-25 min.
22. Drugi raz naniesiono na kolumnę 100 μL AHL i zwirowano 15-25 min.
23. Trzeci raz naniesiono na kolumnę 100 μL AHL i zwirowano 15-25 min. .
24. Przeniesiono kolumny na nowe próbówki 1,5 mL.
25. Naniesiono na kolumnę 100 μL roztworu trypsyny, delikatnie wymieszano na wytrząsarce i inkubowano 16 h w 37 °C w komorze o dużej wilgotności (aby próba nie odparowała podczas inkubacji). Probówki zamknięto w szczelnym pudełku, do którego włożono także kilka mokrych ręczników papierowych.

26. Następnego dnia, zwirowano próby 10 min.
27. Naniesiono na kolumnę 40 μ L AHC i zwirowano 10 min.
28. Zważono ponownie próbkę z próbą (eluatem) w celu określenia objętości eluatu .
29. Zakwaszono próbkę 10% TFA do końcowego stężenia 0.2 % TFA (1:50).
30. Przeniesiono próbkę do próbki 0,5 mL LoBind (nie wiążąca białka na ściankach naczynia, Eppendorf, Niemcy) i przechowywano w temperaturze -80 °C do czasu dalszej analizy.

LC - MS/MS: do analizy wykorzystano spektrometr mas 5500 QTRAP triple quadrupole (AB Sciex) sprzężony z systemem Agilent 1260 Infinity Binary HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy). Do przeprowadzenia analizy użyto oprogramowania Analyst 1.6.3 (Sciex, Darmstadt, Niemcy). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Kinetex® 2,6 μ m C18 100 Å core-shell (100 \times 2,1 mm, Phenomenex, Aschaffenburg, Niemcy) z elucją gradientową przy użyciu acetonitrylu zawierającego 0,1% kwasu mrówkowego (rozpuszczalnik A) i wody zawierającej 0,1% kwasu mrówkowego (rozpuszczalnik B). Szybkość przepływu fazy ruchomej ustalono na 200 μ l/min, a objętość iniekcji wynosiła 20 μ l. Zastosowany gradient stężeń był następujący: 2% rozpuszczalnik A przez 5 min, następnie od 2% do 25% rozpuszczalnika A przez 35 min, następnie wzrost stężenia rozpuszczalnika A do 50% w ciągu 13 min, następnie wzrost stężenia rozpuszczalnika A do 60% przez 3 min. W końcowym etapie zastosowano 2% rozpuszczalnik A w ciągu 9 min. Temperatura kolumny była ustawiona na 50 °C, podczas gdy temperatura autosamplera była ustawiona na 4 °C. Spektrometr mas wyposażony był w źródło jonizacji elektroprayowej (ESI) Turbo V™ Ion Source pracujące z zastosowaniem następujących warunków: temperatura źródła: 500 °C; napięcie dyspersji jonów: 5500 V; gaz kurtynowy: 50 psi; gaz źródła jonów 1: 50 psi; gaz źródła jonów 2: 50 psi oraz gaz o wysokiej aktywacji zderzeń. Parametry spektrometrii mas, takie jak potencjał deklustracji i energia kolizji, zostały ręcznie zoptymalizowane dla każdego pojedynczego peptydu. Dla każdego analitu i standardu wewnętrznego monitorowano trzy do czterech przejść masowych. Wszystkie chromatogramy oceniano za pomocą oprogramowania MultiQuant™ 3.0.2, stosując metodę standardu wewnętrznego i współczynniki powierzchni piku do obliczania bezwzględnych ilości białka.

Szczegółowy opis metody oraz sekwencje badanych peptydów przedstawiono w publikacji: Wenzel C., Drozdziak M., Oswald S. *Mass spectrometry-based targeted proteomics method for the quantification of clinically relevant drug metabolizing enzymes in human specimens*. Journal of Chromatography B 1160. 2021.[147]

3.4. GENOTYPOWANIE

Genomowy DNA wyizolowano z tkanek przy użyciu zestawu Tissue DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska), zgodnie z protokołem producenta (25 mg) a następnie standaryzowano do jednolitego stężenia (20 ng/μl) na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego (Denovix, Wilmington, DE, USA) i przechowywano w -20 °C do czasu dalszej analizy. Wszystkie próbki poddano genotypowaniu przy użyciu aparatu i oprogramowania dla urządzenia ViiA7 Fast Real-Time PCR z użyciem zestawu walidowanego przez producenta TaqMan assays, dedykowanego do wykrywania badanych jednonukleotydowych polimorfizmów (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Analizowano następujące warianty (tabela 7): *CYP2C19**2 (rs4244285), *CYP2D6**3 (rs35742686), *CYP2D6**4: rs3892097) i *CYP3A5**3 (rs rs776746). W badaniu wykorzystano zestaw odczynników TaqMan™ GTXpress™ Master Mix, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) do przygotowania mieszaniny reakcyjnej (4,5 μL mieszaniny na każdą próbkę oraz 1 μL DNA). Profil temperaturowy reakcji zaprogramowano następująco: aktywacja 20 s, 95°C, 40 cykli (denaturacja+przyłączanie starterów i sond i wydłużanie): 3 s 95°C + 30s 60°C. Dodatkowo, liczbę kopii genu *CYP2D6*, w tym delecję genu *CYP2D6* (*CYP2D6**5) oceniano metodą qPCR z sondami TaqMan dla *CYP2D6* (Assay ID: Hs00010001_cn) i genu referencyjnego *RPPH1*, z użyciem odczynników TaqMan™ Fast Advanced Master Mix, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) do przygotowania mieszaniny reakcyjnej (13,5 μL mieszaniny na każdą próbkę oraz 1,5 μL DNA). Profil temperaturowy reakcji zaprogramowano następująco: aktywacja 20 s, 95°C, 40 cykli (denaturacja+ przyłączanie starterów i sond i wydłużanie): 3 s 95°C + 30s 60°C. Do analizy wybrano te warianty, które ze względu na ich konsekwencje mogą, wg. danych literaturowych, wpływać nie tylko na aktywność kodowanego enzymu, ale także na ilość powstającego RNA i białka, mierzonego w niniejszej pracy. Z tego powodu do analizy nie włączono zmian typu *missense*, które według własnych badań wstępnych nie miały wpływu na ilość białka w wątrobach kontrolnych.

Tabela 7. Lista sond TaqMan użytych w badaniu.

BADANY WARIANT GENU	LOKALIZACJA CHROMOSOMOWA	TaqMaN Assay ID	ZMIANA NUKLEOTYDOW A	NUMER RS
CYP2C19*2	Chr.10: 94781859	C__25986767_7 0	A/G	rs4244285
CYP2D6*3	Chr.22: 42128242	C__32407232_5 0	T/-	rs35742686
CYP2D6*4	Chr.22: 42128945	C__27102431_ D0	C/T	rs3892097
CYP3A5*3	Chr.7: 99672916	C__26201809_3 0	T/C	rs776746

3.5. OBLICZENIA STATYSTYCZNE

Wszystkie dane dotyczące poziomu mRNA i białka: średnie \pm odchylenie standardowe, CV%, mediana oraz wartości minimalne i maksymalne podano w tabelach 8, 9, 10 jako informacje uzupełniające w suplemencie do artykułu, będącego załącznikiem w niniejszej pracy. Do obliczeń użyto wyników uzyskanych dla wszystkich próbek, a te z niewykrywalnym stężeniem białka (LLOQ, mniejsze lub równe 0,1 nmol/l) zastąpiono zerem. Różnice między badanymi grupami oceniano za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala–Wallisa połączonego z testem post hoc Dunna z korektą Bonferroniego, a do zbadania korelacji użyto testu rang Spearmana. Za istotne statystycznie uznano wartości $p < 0,05$. Wszystkie obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu oprogramowania R 4.2.2 (Institute for Statistics and Mathematics of WU [Wirtschaftsuniversität Wien], Austria).

4. KORZYŚCI BADAŃ

Bezpośrednim wynikiem realizacji projektu będą dane na temat wpływu występowania stanu zapalnego, wywołanego czynnikiem wirusowym, na ekspresję enzymów metabolizujących leki w komórkach tkanki wątrobowej pacjentów chorych na HCV. Pośrednio, badania pomogą w zrozumieniu mechanizmów wpływających na ekspresję enzymów metabolizujących leki w chorobach zakaźnych wątroby. Uzyskane wyniki mogą być przydatne w ocenie biodostępności i farmakokinetyki leków w przebiegu infekcyjnych chorób wątroby, a także tworzeniu nowych strategii terapeutycznych.

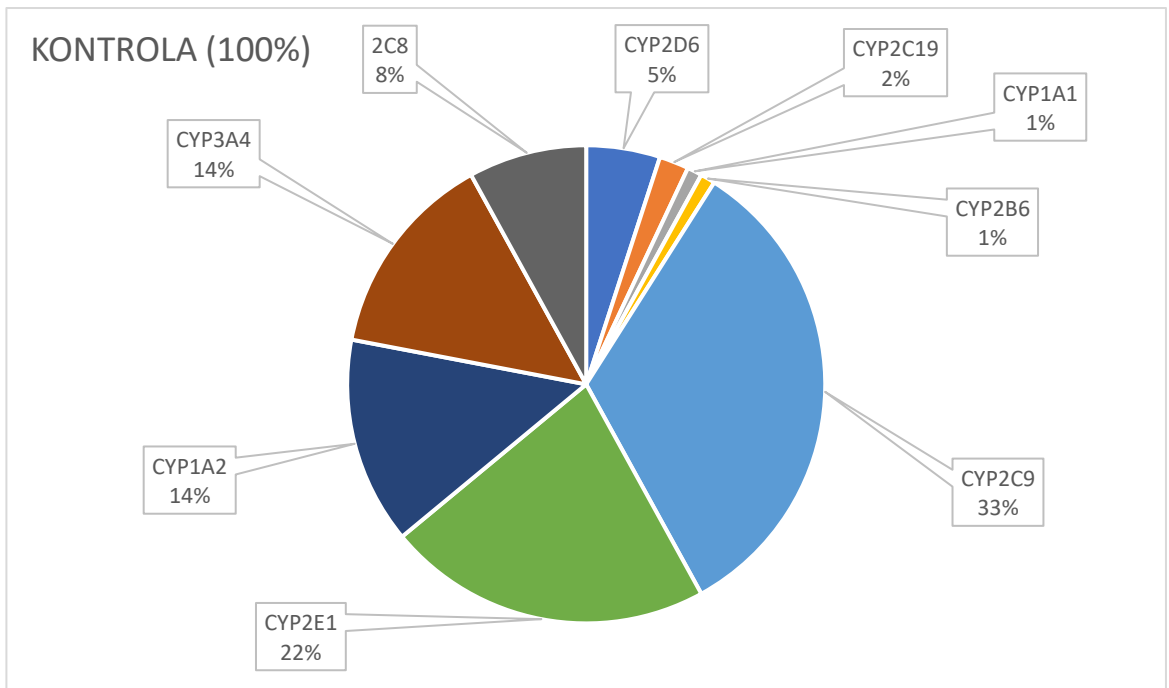
5. WYNIKI I OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

5.1. Ilościowe określenie zawartości RNA i białek wybranych enzymów CYP450 i UGT

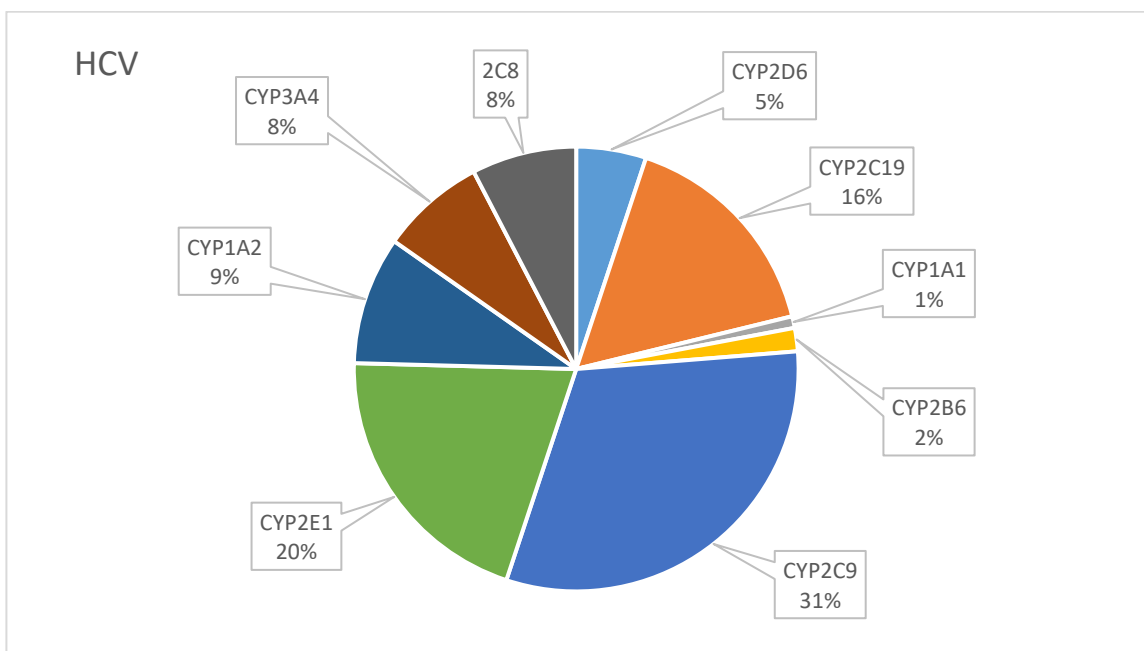
Dane uzyskane w badaniach, pokazują, że przebieg HCV występujący w obrębie tkanki wątrobowej, może mieć znaczący wpływ na ekspresję genów, biorących udział w metabolizmie leków, zarówno mierzonych na poziomie RNA jak i białka (rysunek 41 – rysunek 54).

Poniżej na wykresach kołowych (rysunek 36 – rysunek 40) przedstawiono udział procentowy białek enzymatycznych w wątrobach pacjentów z HCV, podzielonych na grupy na podstawie stopnia niewydolności wątroby, określonego na podstawie punktacji Childa-Pugha (klasa A, B i C) oraz w grupie kontrolnej. We wszystkich grupach pacjentów CYP2C9, CYP2E1, CYP1A2 i CYP3A4 wykazały największe stężenia białka w tkance wątrobowej, podczas gdy CYP2B6, CYP1A1 i CYP2C19 występowały tylko w niewielkich ilościach (~1-2%). Chociaż procentowy udział poszczególnych białek w puli enzymów metabolizujących leki był podobny, całkowita ich ilość (w przeliczeniu na masę tkanki) była różna, w zależności od stopnia niewydolności wątroby.

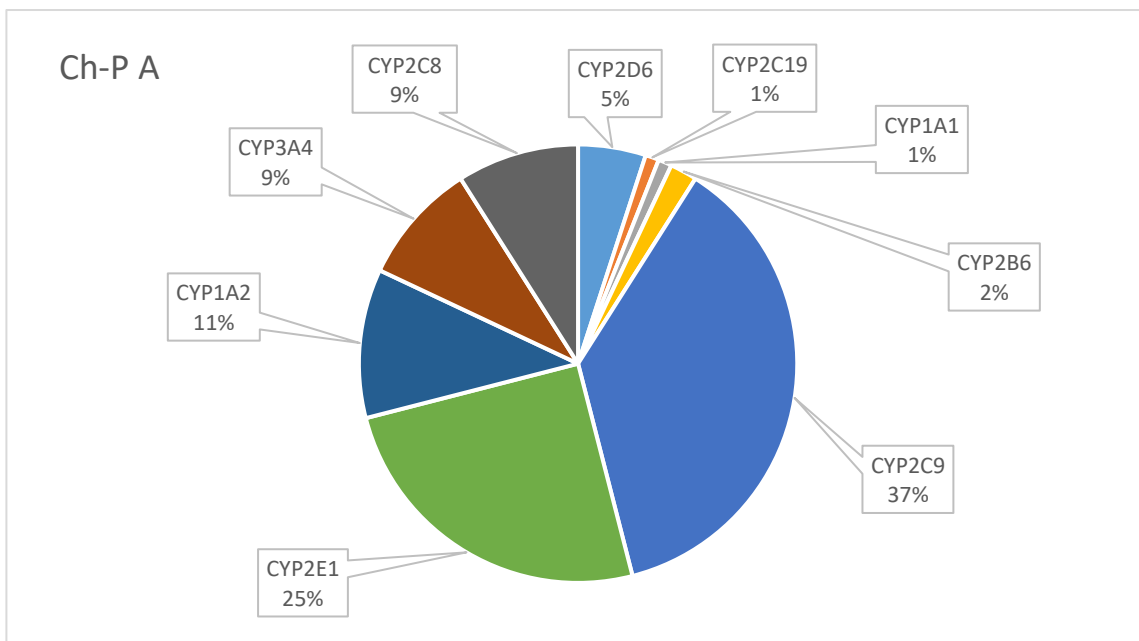
Zakażenie HCV nie miało istotnego wpływu na zawartość białka kilku enzymów, tj. w CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A5. Wątroby klasy A wg Childa-Pugha charakteryzowały się znacznym podwyższeniem zawartości białka UGT1A1 (do 163% wartości zmierzonej dla kontroli). Klasa B Childa-Pugha wiązała się z mniejszą zawartością CYP2C19 (do 38% wartości dla grupy kontrolnej), CYP2E1 (do 54% kontroli), CYP3A4 (do 33% kontroli), UGT1A3 (do 69% kontroli) i UGT2B7 (do 56% kontroli). Stwierdzono również istotne zmniejszenie stężenia CYP1A2 (do 52% kontroli) i UGT2B7 (do 20% kontroli) w stadium C wg Childa-Pugha. Udokumentowano istotnie statystycznie obniżenie zawartości CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, UGT2B7 i UGT2B15. Łączna analiza wszystkich prób od pacjentów z HCV wykazała, że choroba nie wpływała znacząco na zawartość białka CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 i UGT1A3 w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Odnotowano znacząco zmniejszoną zawartość CYP1A2 (do 64% kontroli), CYP2C19 (do 45% kontroli), CYP3A4 (do 47% kontroli) i CYP3A5 (do 55% kontroli), jak również UGT2B7 (do 70% kontroli), UGT2B15 (do 79% kontroli) i wyraźny wzrost UGT1A1 (do 177% kontroli).



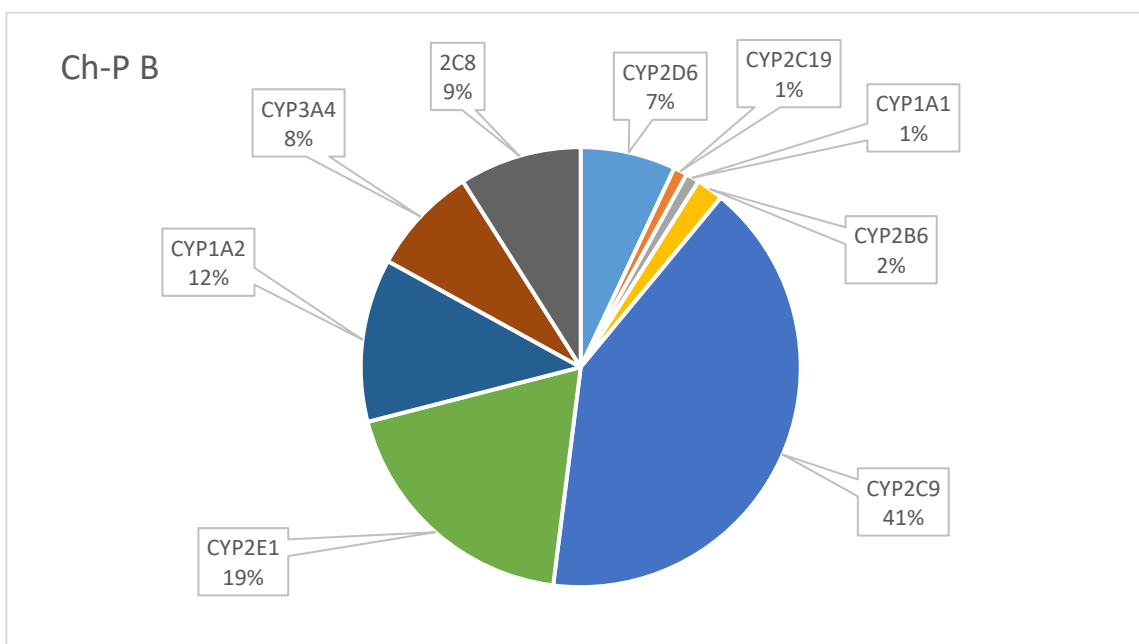
Rysunek 36. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w grupie kontrolnej. Wykres przedstawia rozkład procentowy poszczególnych białek biorących udział w metabolizmie leków w całkowitej zawartości wszystkich białek, będących przedmiotem analizy.



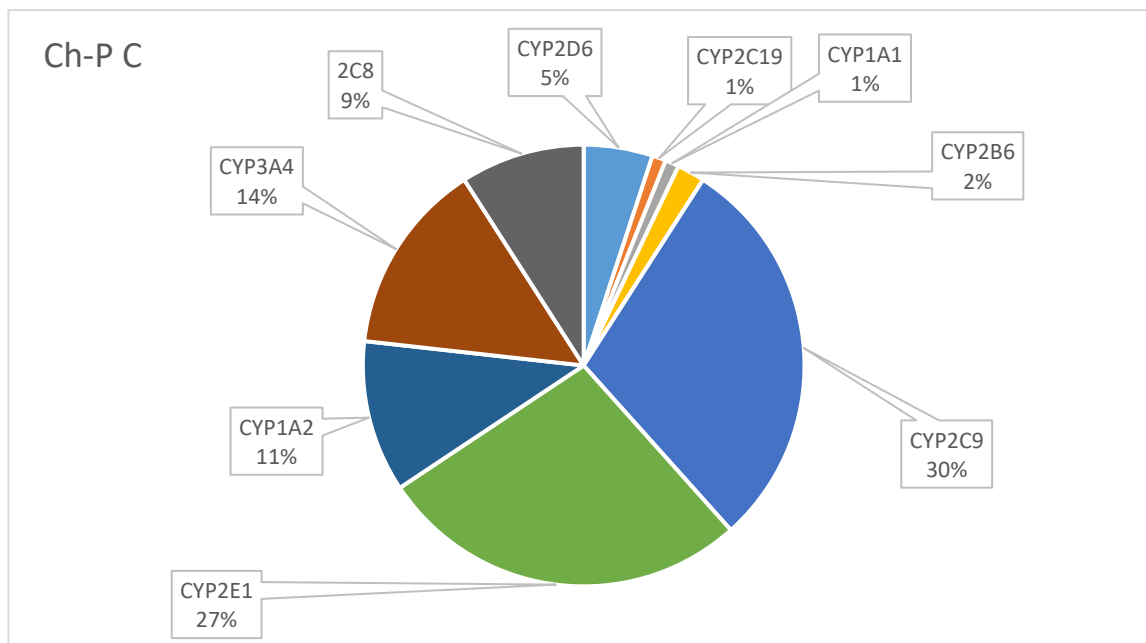
Rysunek 37. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV. Wykres przedstawia rozkład procentowy poszczególnych białek biorących udział w metabolizmie leków w całkowitej zawartości wszystkich białek, będących przedmiotem analizy.



Rysunek 38. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy A wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Wykres przedstawia rozkład procentowy poszczególnych białek biorących udział w metabolizmie leków w całkowitej zawartości wszystkich białek, będących przedmiotem analizy.



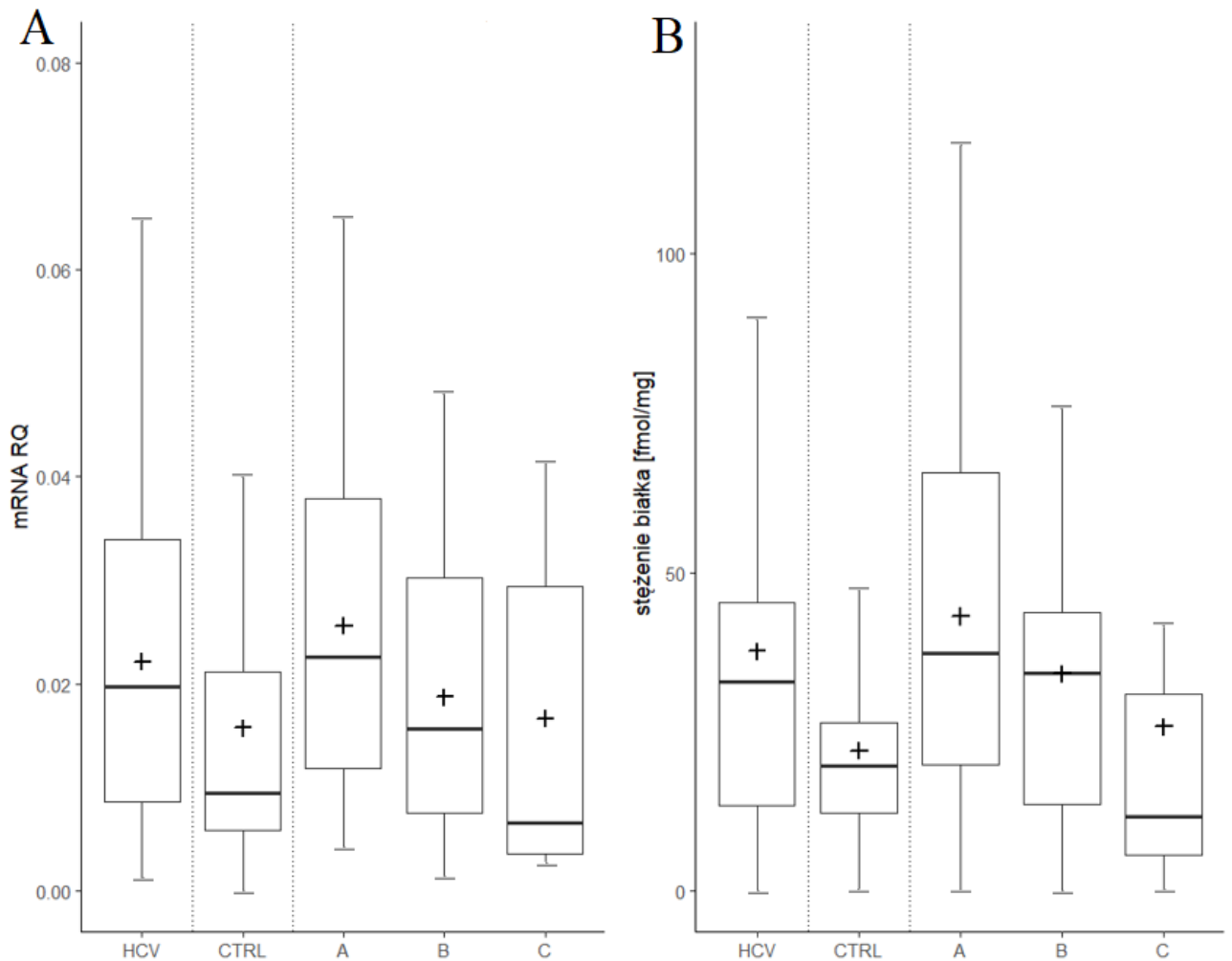
Rysunek 39. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy B wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Wykres przedstawia rozkład procentowy poszczególnych białek biorących udział w metabolizmie leków w całkowitej zawartości wszystkich białek, będących przedmiotem analizy.



Rysunek 40. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy C wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Wykres przedstawia rozkład procentowy poszczególnych białek biorących udział w metabolizmie leków w całkowitej zawartości wszystkich białek, będących przedmiotem analizy.

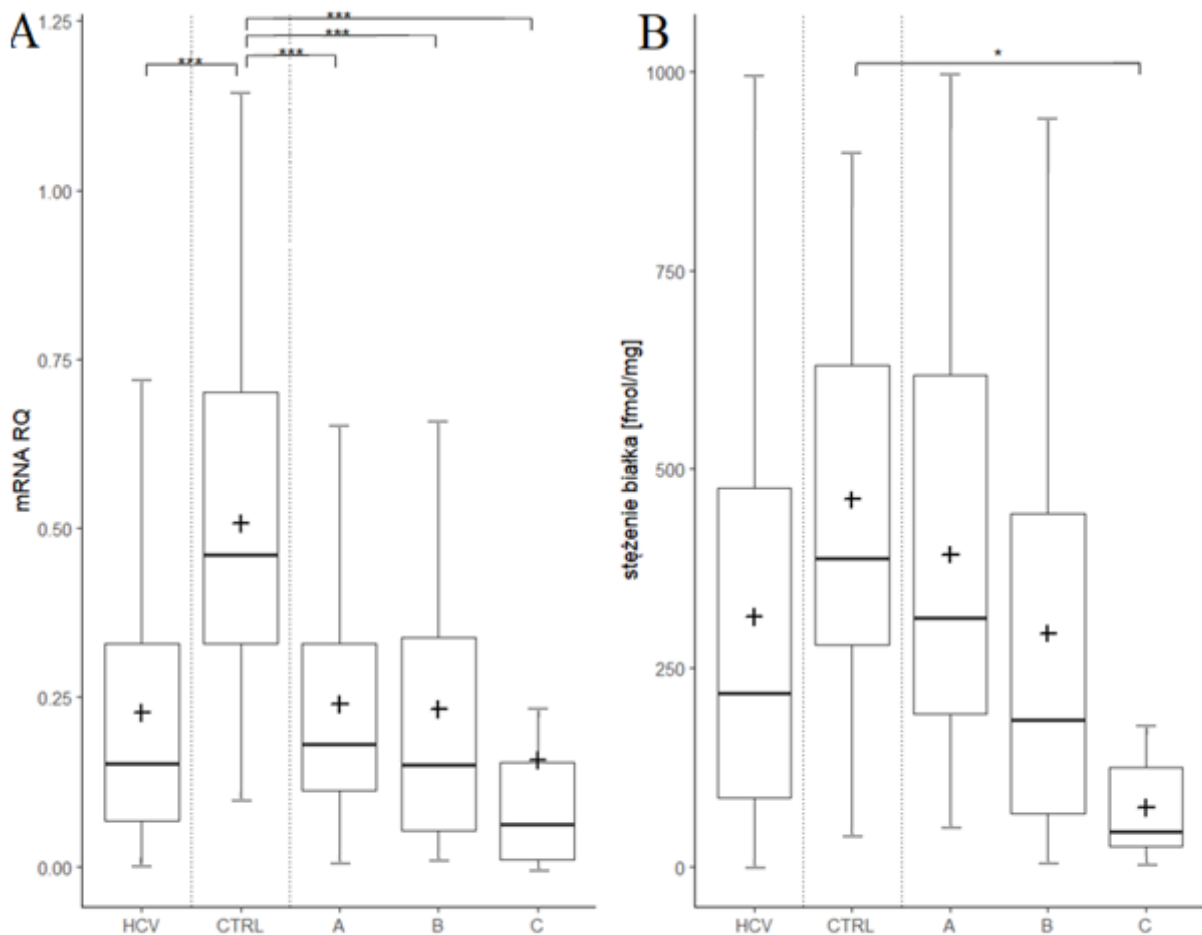
Zamieszczone poniżej wykresy przedstawiają ekspresję genów kodujących badane enzymy metabolizujące leki w wątrobie: jako względną ekspresję mierzoną na poziomie RNA (metoda delta CT, bez normalizacji na tkankę kontrolną) oraz jako stężenie białka w tkance wątrobowej (fmol/mg tkanki).

W przypadku CYP1A1 (rysunek 41), nie zanotowano istotnych różnic w zawartości/stężeniu białka. Choroba nie miała wpływu także na występowanie istotnych zmian w poziomie ekspresji mRNA.



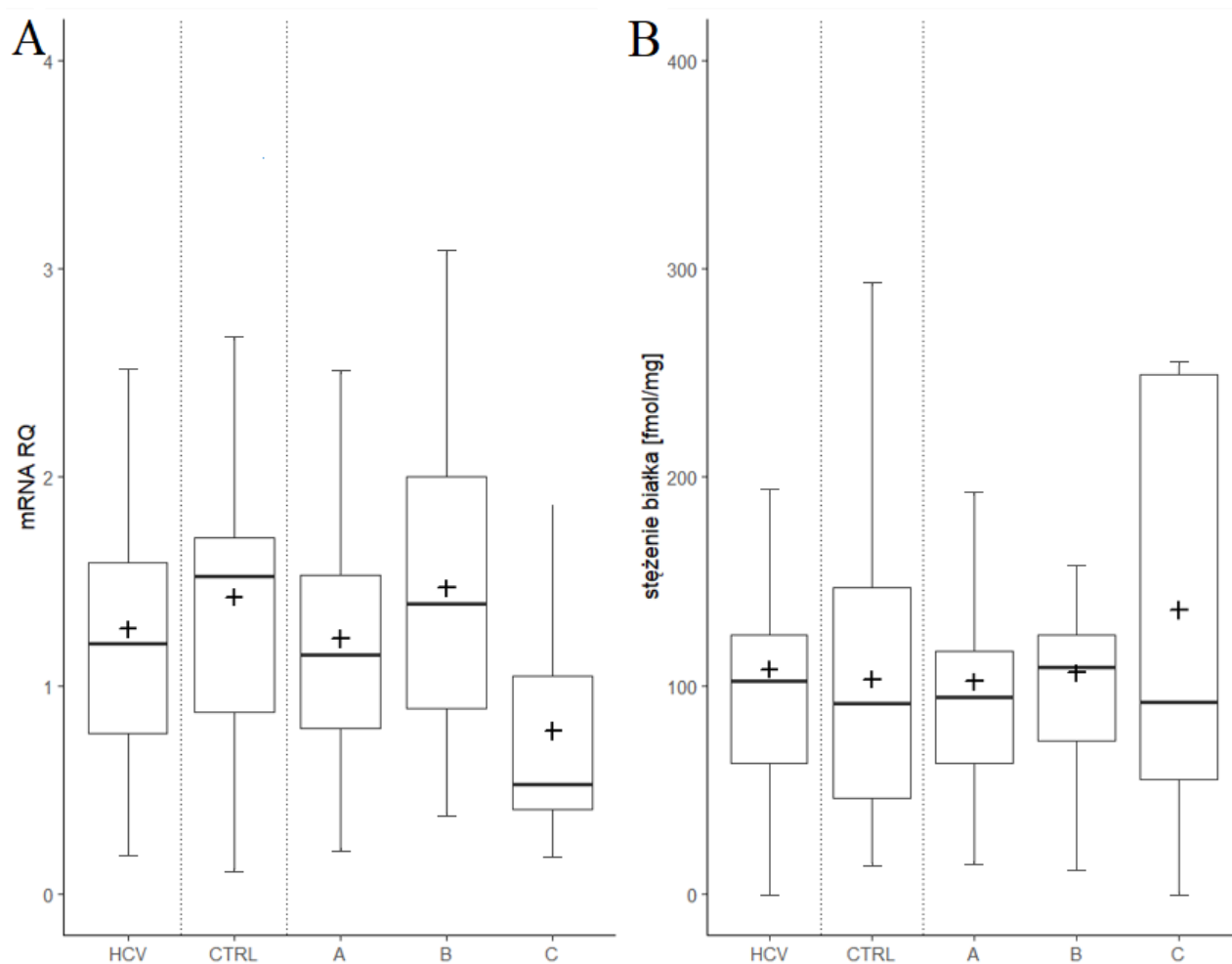
Rysunek 41 . Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP1A1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$.

W przypadku CYP1A2 (rysunek 42) zaobserwowano istotnie mniejszą zawartość białka (do 52% wartości zmierzonej dla grupy kontrolnej) w przypadku bardzo zaawansowanego stanu niewydolności wątroby w przebiegu HCV (klasa C Ch-P) oraz w przypadku łącznej analizy wszystkich pacjentów z HCV. W przypadku mRNA również zaobserwowano zmniejszoną ekspresję: HCV (o 68%), CH-P A (o 62%), CH-P B (o 68%) oraz CH-P C (o aż 87%) w stosunku do prób kontrolnych.



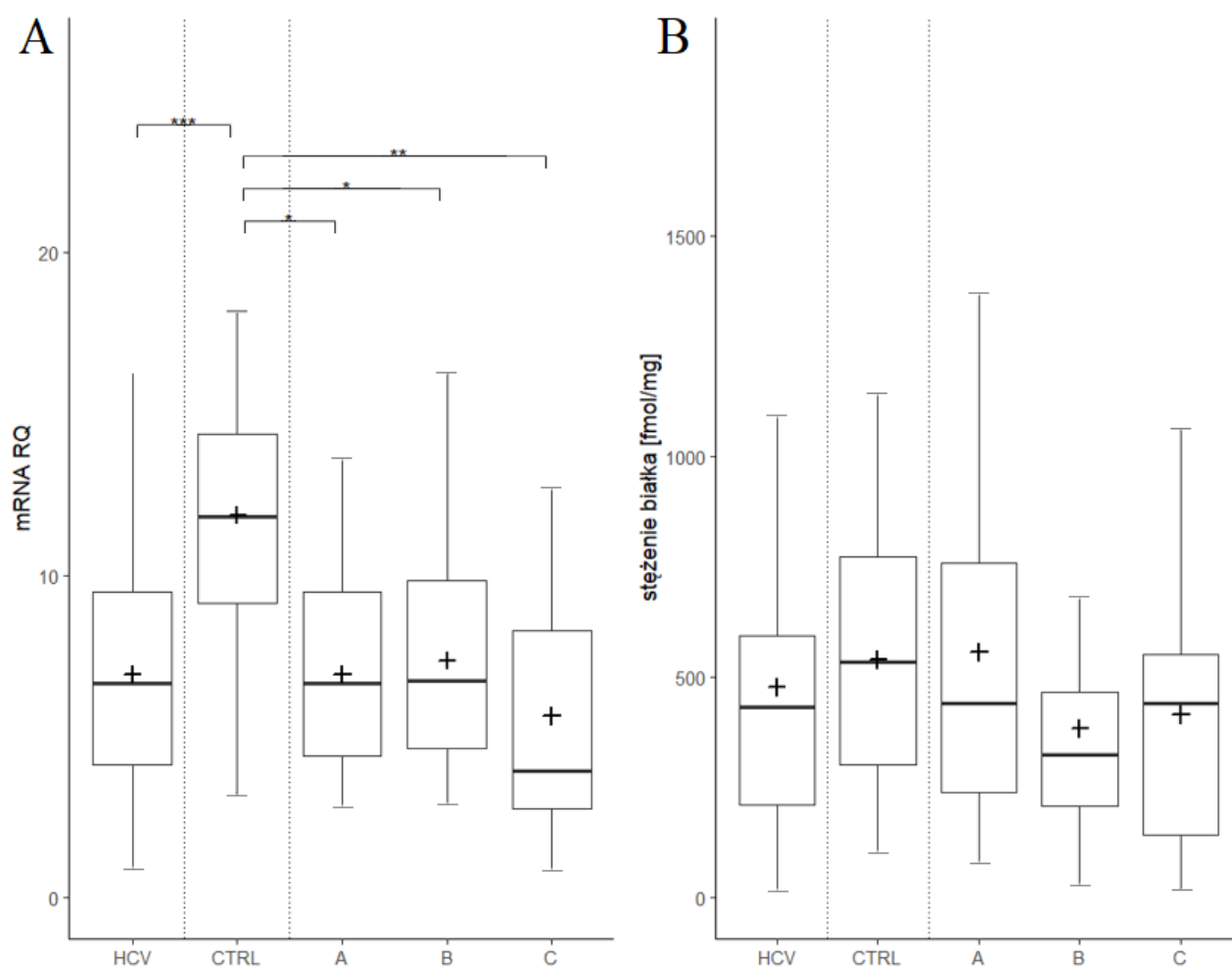
Rysunek 42. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP1A2 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

W przypadku CYP2B6 (rysunek 43) zawartość białka w wątrobie pacjentów z HCV nie różniła się istotnie od pacjentów z grupy kontrolnej. Również nie zaobserwowano zmian w ekspresji genu mierzonej na poziomie mRNA.



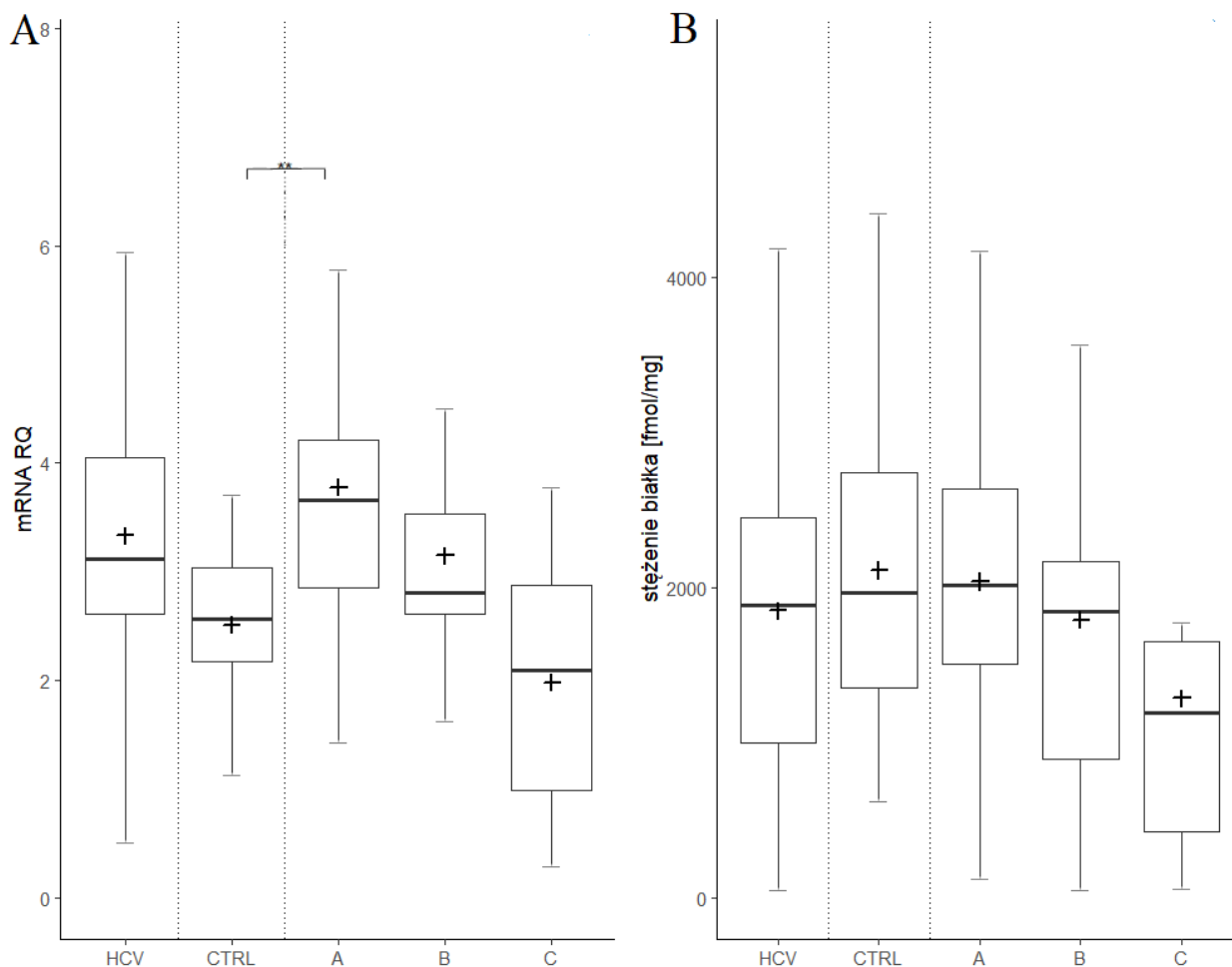
Rysunek 43. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2B6 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej różnic istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dla CYP2C8 (rysunek 44) również nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości białka, mimo występowania istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA: HCV (mniejsza o 43% w porównaniu do kontroli), CH-P A (o 43%), CH-P B (o 43%) i CH-P C (o 66%).



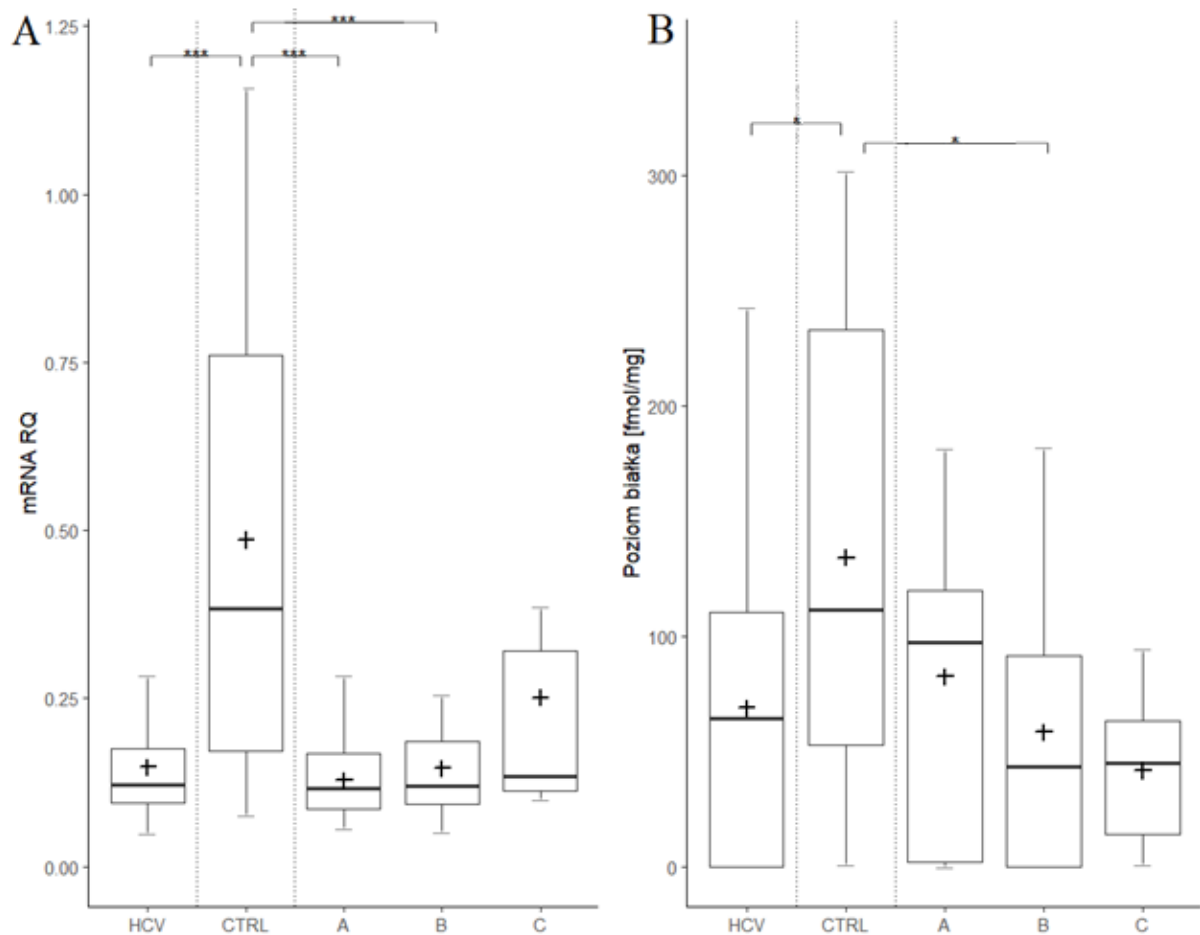
Rysunek 44. Poziom ekspresji (Rys. A.) i stężenie białka (Rys.B.) CYP2C8 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

Zawartość białka dla CYP2C9 (rysunek 45) także nie była zmieniona wśród pacjentów z HCV w porównaniu do grupy kontrolnej. W poziomie ekspresji mRNA największe istotne zmiany zaobserwowano w przypadku CH-P A (większa o 43%), w stosunku do kontroli.



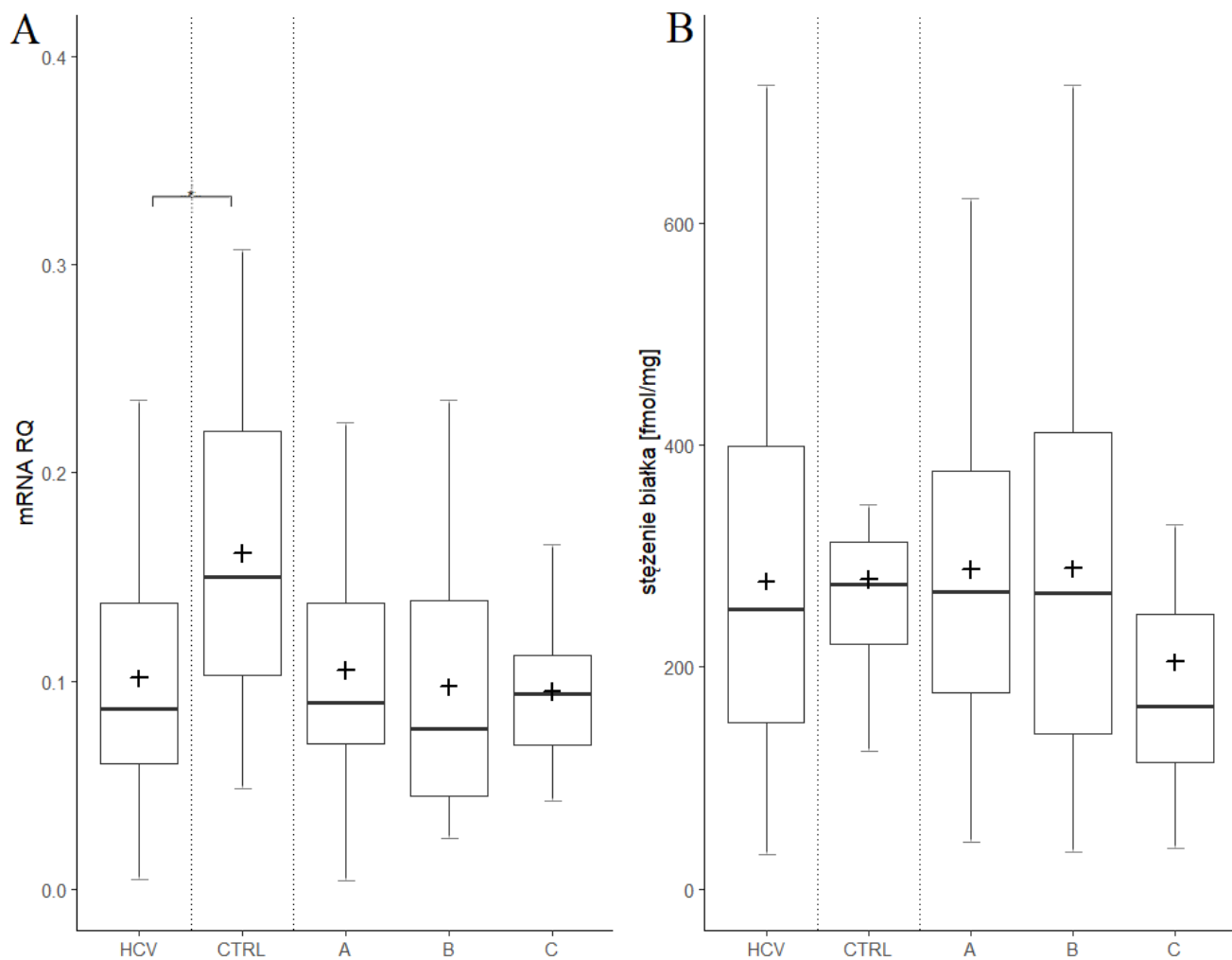
Rysunek 45. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2C9 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

W przypadku CYP2C19 (rysunek 46) zaobserwowano istotnie mniejsze stężenia białka dla klasy B Ch-P, w porównaniu z grupą kontrolną (o 65%). Istotnie mniejsze stężenie białka zaobserwowano również dla całej grupy HCV (o 49%). W przypadku ekspresji mRNA zaobserwowano istotne różnice – obniżenie zawartości mRNA dla grup: HCV (o 69%), CH-P A (o 69%), CH-P B (o 69%), w stosunku do prób kontrolnych.



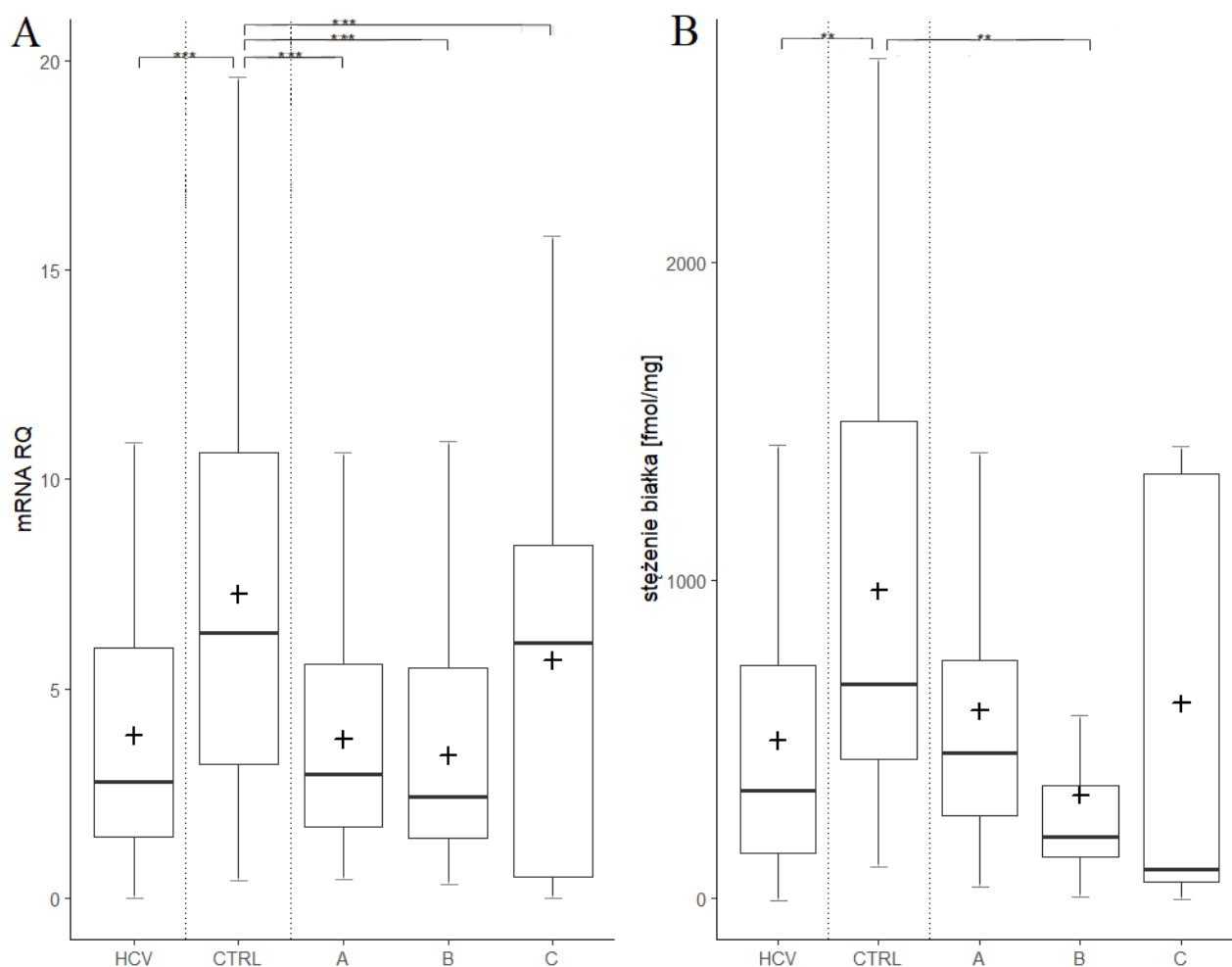
Rysunek 46. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2C19 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

W przypadku CYP2D6 (rysunek 47), zawartość białka nie była zmieniona u pacjentów z HCV na poszczególnych stadiach niewydolności wątroby, ani też nie zaobserwowano istotnych zmian w ekspresji genów mierzonej na poziomie mRNA, poza łączną analizą całej grupy HCV (wartość mniejsza o 40%), w stosunku do grupy kontrolnej.



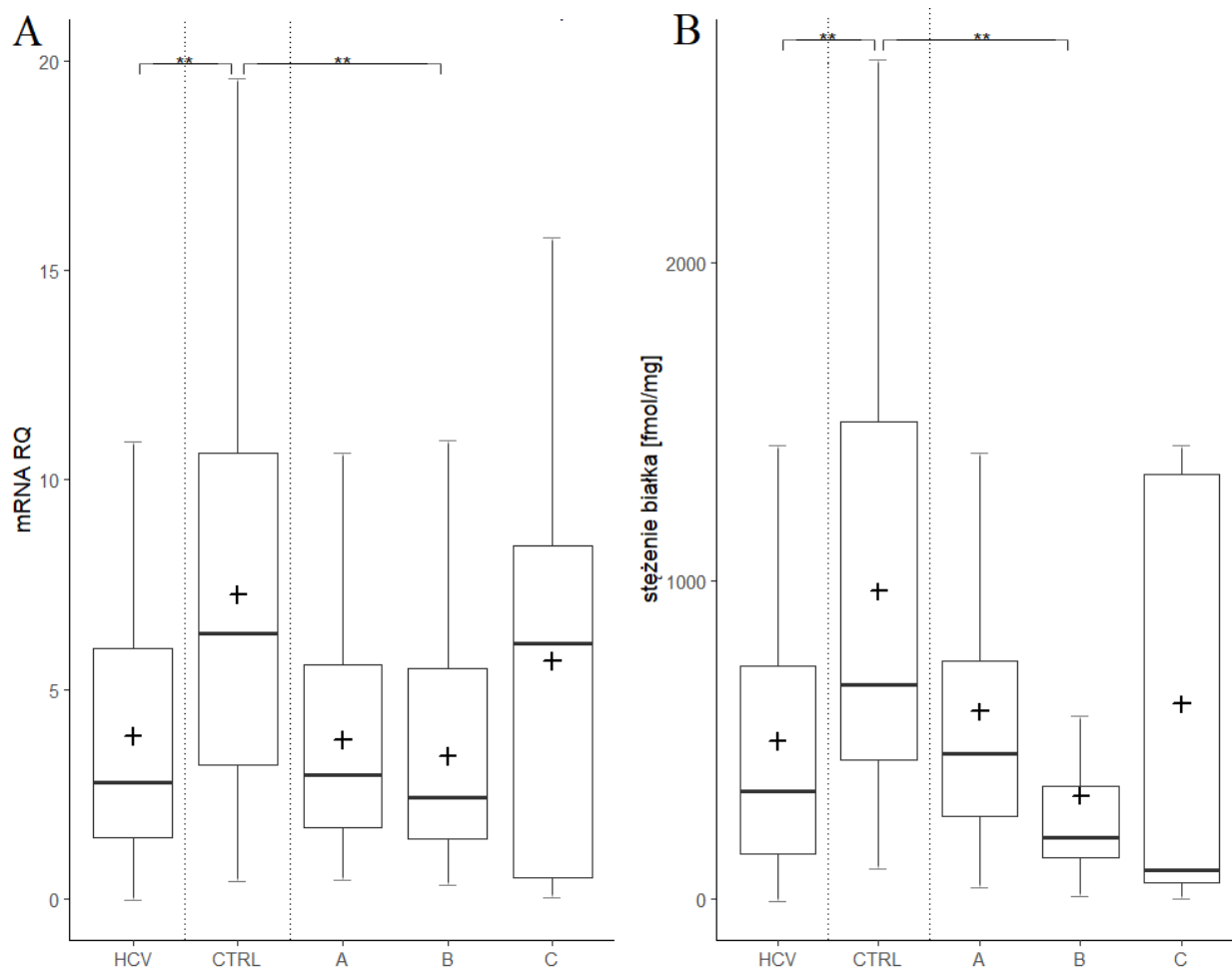
Rysunek 47. Poziom ekspresji (Rys. A.) i stężenie białka (Rys.B.) CYP2D6 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

W odniesieniu do CYP2E1 (rysunek 48) zaobserwowano znacząco niższe wartości stężenia białka w porównaniu do prób kontrolnych w przypadku klasy B Ch-P (aż o 54%), co było zgodne z wynikami pomiaru ekspresji mRNA, w którym odnotowano istotnie niższe wartości dla wszystkich grup: HCV (o 55%), CH-P A (o 55%), CH-P B (o 55%), CH-P C (o 61%), w stosunku do prób kontrolnych.



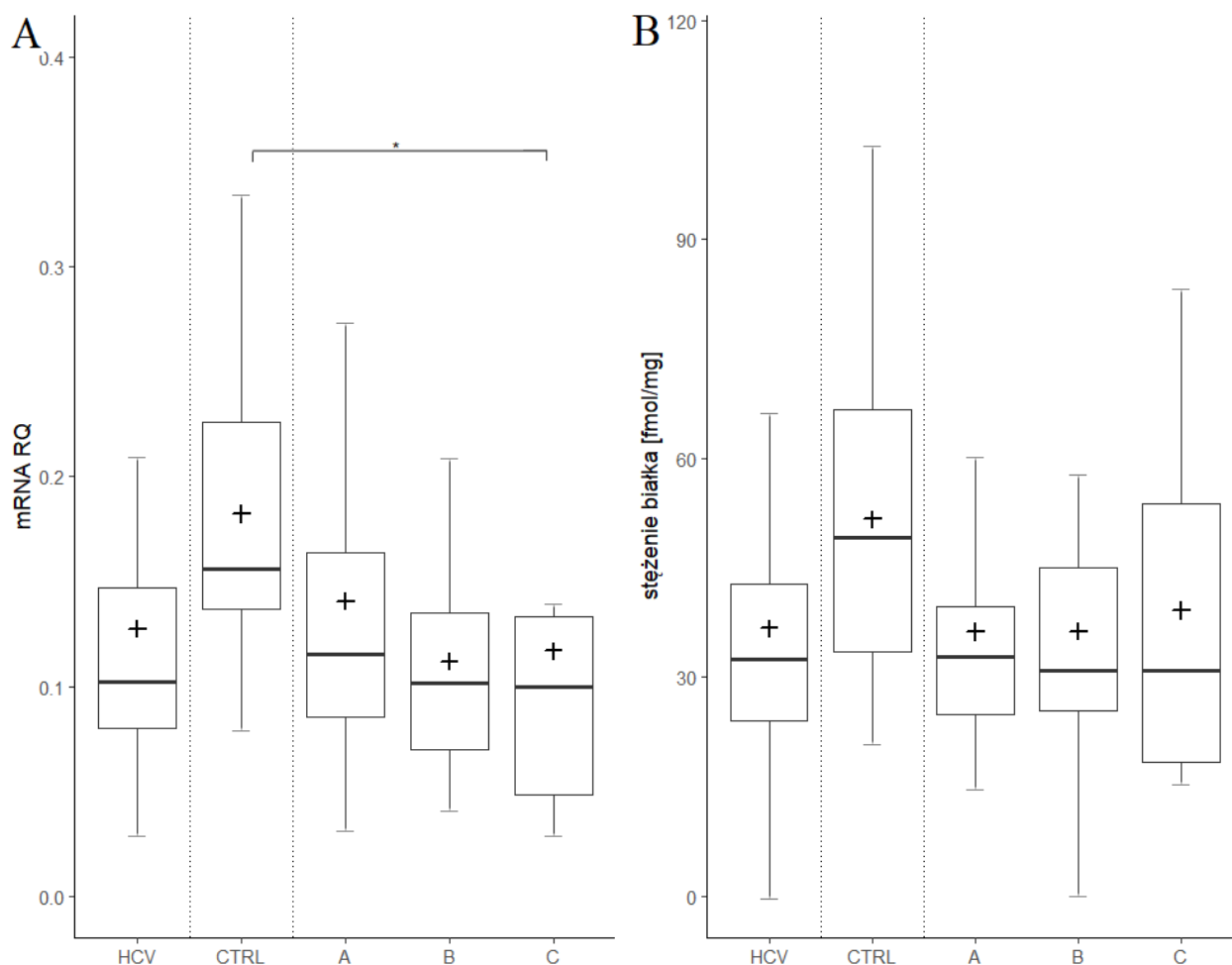
Rysunek 48. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2E1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dla prób pochodzących od pacjentów sklasyfikowanych jako klasa B w skali Ch-P – w przypadku CYP3A4 (rysunek 49) zaobserwowano istotnie niższe stężenie białka (o 34% w stosunku do kontroli). W przypadku ekspresji mRNA, zaobserwowano istotnie niższe wartości w łącznej analizie całej grupy HCV (o 56%), w stosunku do kontroli.



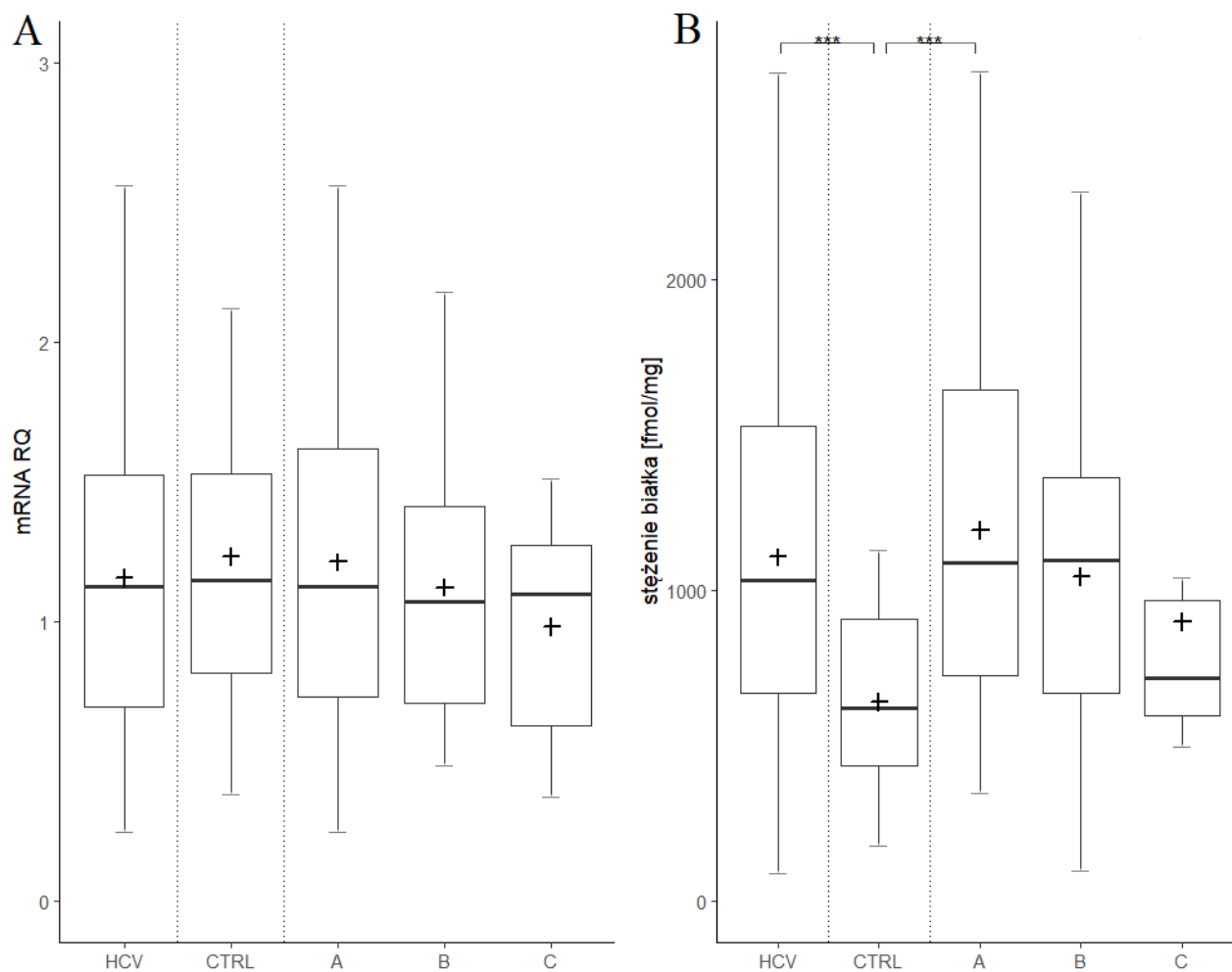
Rysunek 49. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP3A4 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu *boxplot*, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Dla białka CYP3A5 (rysunek 50) nie zaobserwowano istotnych zmian w stężeniu w grupie HCV ani w podgrupach o różnym nasileniu niewydolności wątroby, w porównaniu do prób kontrolnych. Ekspresja genu była istotnie mniejsza w grupie CH-P C, w porównaniu z kontrolą.



Rysunek 50. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP3A5 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

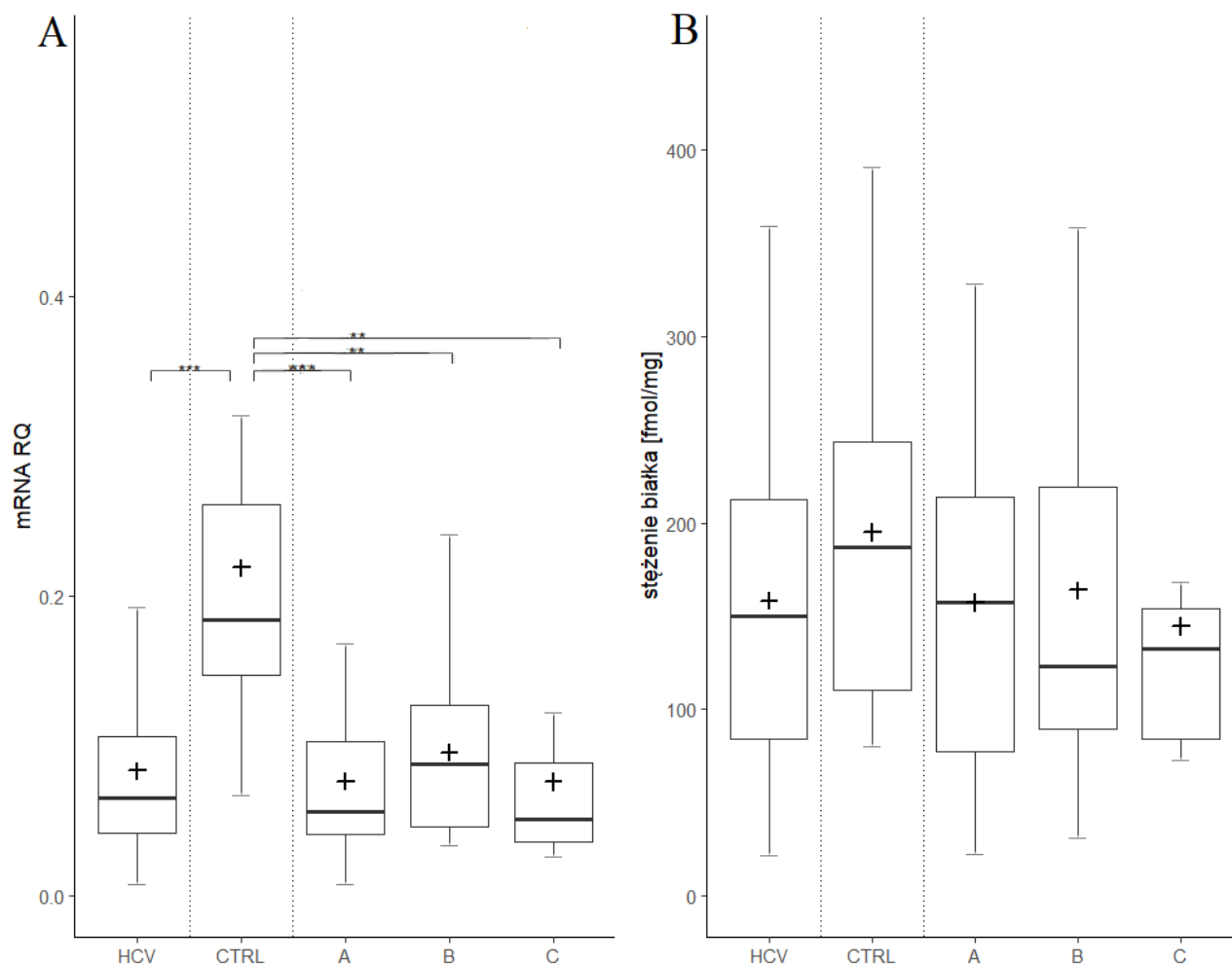
Zawartość białka UGT1A1 (rysunek 51) była istotnie większa (o 163% w stosunku do prób kontrolnych), w przypadku prób pochodzących od pacjentów zaklasyfikowanych jako A w skali Ch-P. Łączna analiza wszystkich prób od pacjentów z HCV wykazała, że zawartość białka UGT1A1 była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej, co jednak nie wynikało ze zwiększonej ekspresji genu mierzonej na poziomie mRNA.



Rysunek 51. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT1A1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20).

Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

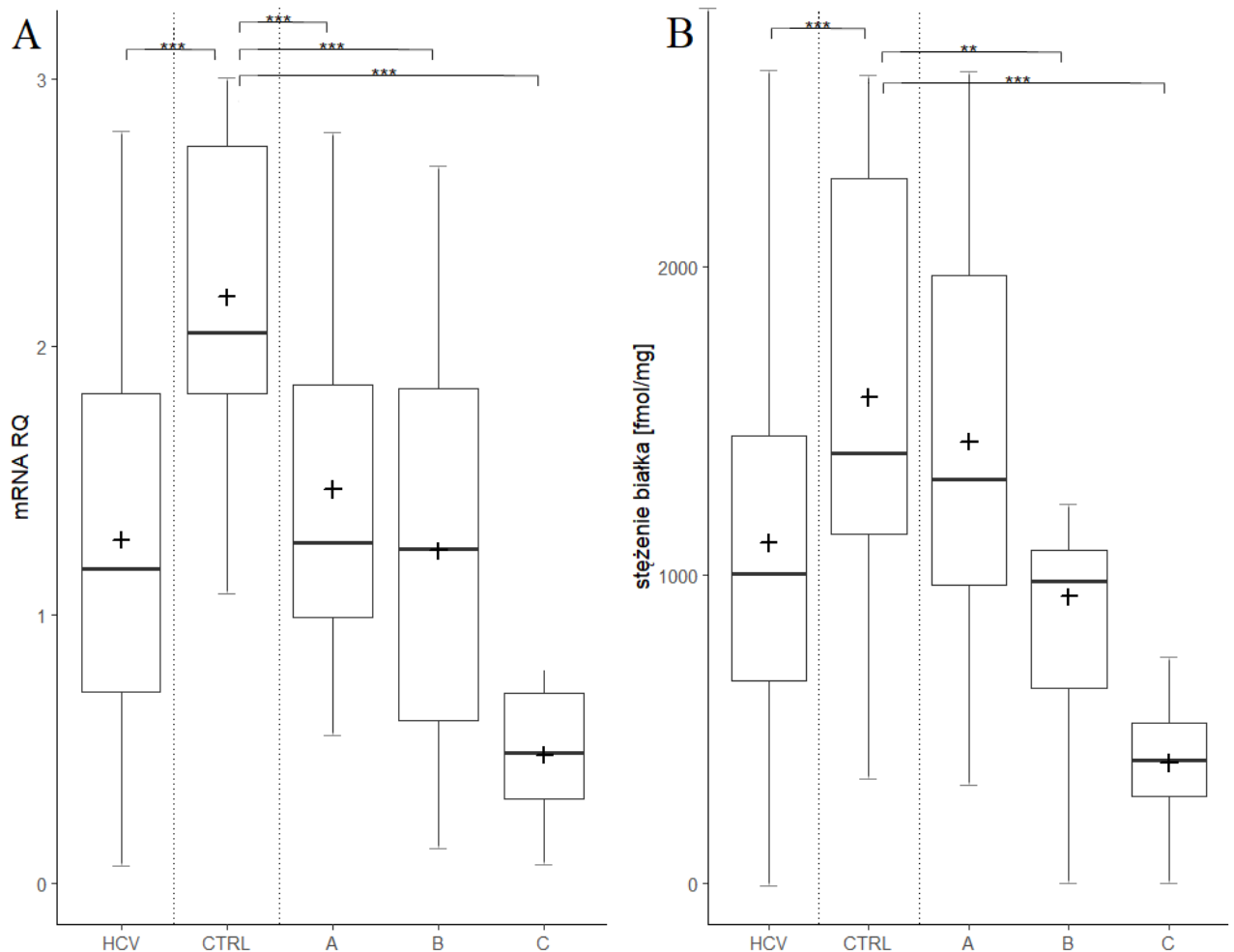
Zawartość białka UGT1A3 (rysunek 52) była istotnie mniejsza (o 69%), w stosunku do kontroli, w próbach klasy B Ch-P. Zaobserwowano również znacząco niższą ekspresję mRNA dla wszystkich grup, w porównaniu do kontroli.



Rysunek 52. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT1A3 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20).

Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

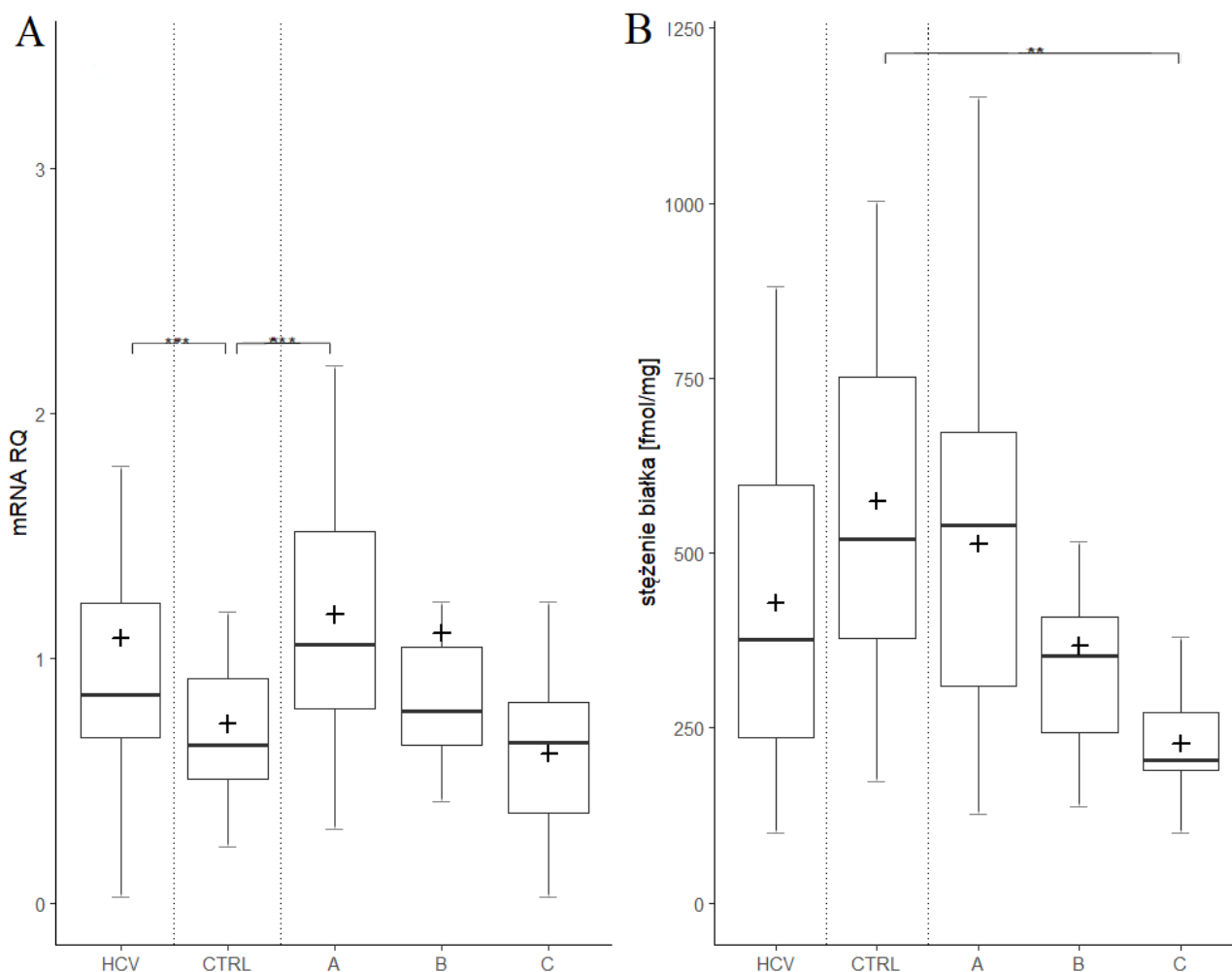
Zawartość białka UGT2B7 (rysunek 53) była istotnie niższa, w stosunku do kontroli, we wszystkich grupach: HCV (o 38%), CH-P A (o 7,7%), CH-P B (o 41%), CH-P C (o 76%). Zaobserwowano również znaczące obniżenie ekspresji mRNA dla wszystkich grup, w porównaniu do kontroli: HCV (o 56%), CH-P A (o 52%), CH-P B (o 53%), CH-P C (o 81%).



Rysunek 53. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT2B7 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20).

Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: różnice istotne: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Zawartość białka UGT2B15 (rysunek 54) była istotnie niższa, w stosunku do kontroli, w grupie HCV (o 28%). Zaobserwowano również znacząco niższą ekspresję mRNA w obrębie grup: HCV (o 30%), CH-P A (o 61%), w porównaniu do kontroli.



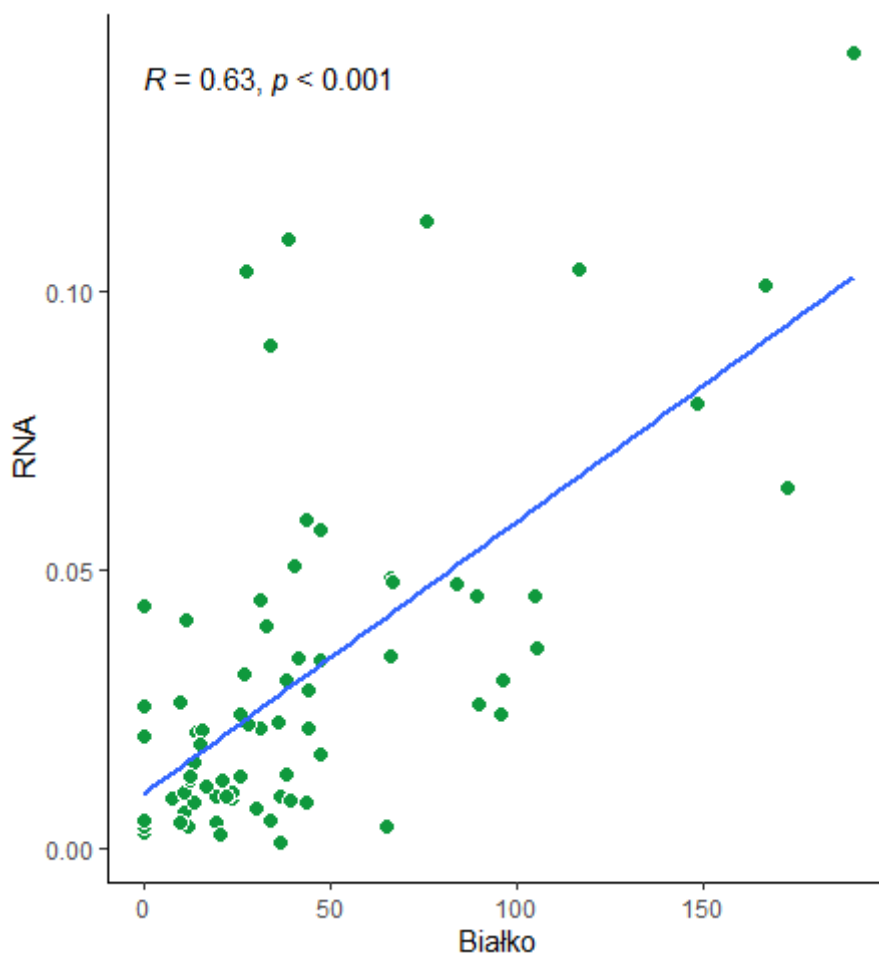
Rysunek 54. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT2B15 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20).

Do wygenerowania danych użyto wykresów typu boxplot, uwzględniających: medianę (linia pozioma) oraz pierwszy kwartył Q1 (dół pudełka) i trzeci kwartył Q3 (górną część pudełka), a także minimalne i maksymalne wartości (wąsy) oraz średnią (znak +). Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. Przyjęto następującą skalę istotności statystycznej: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka

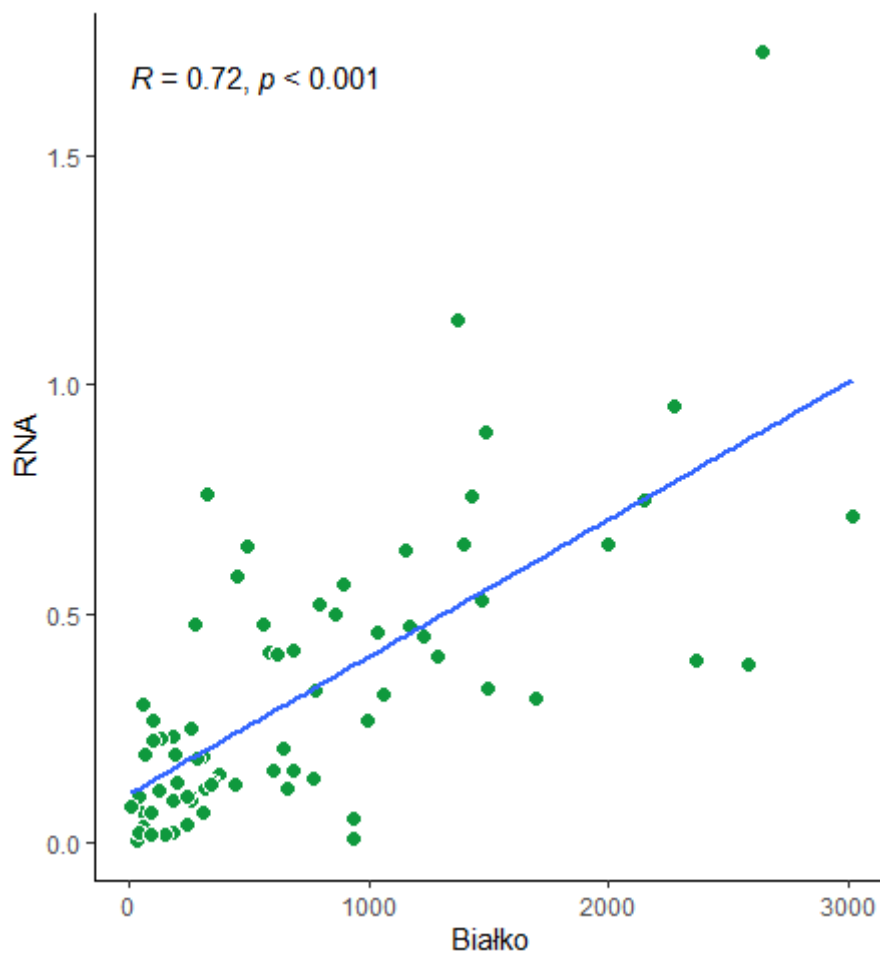
Na rysunkach 55 – 68, przedstawiono wykresy korelacji ekspresji mRNA i zawartości białka badanych genów (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT2B7*, *UGT2B15*) w grupie

pacjentów z HCV (n=58). Wyniki wykazały pozytywną korelację dla wszystkich analizowanych białek, co oznacza, że wraz ze wzrostem ekspresji mRNA, wzrastała również zawartość białka kodowanego przez wszystkie analizowane geny. Wartość współczynnika korelacji R wskazuje na różną siłę tej zależności w przypadku poszczególnych genów.



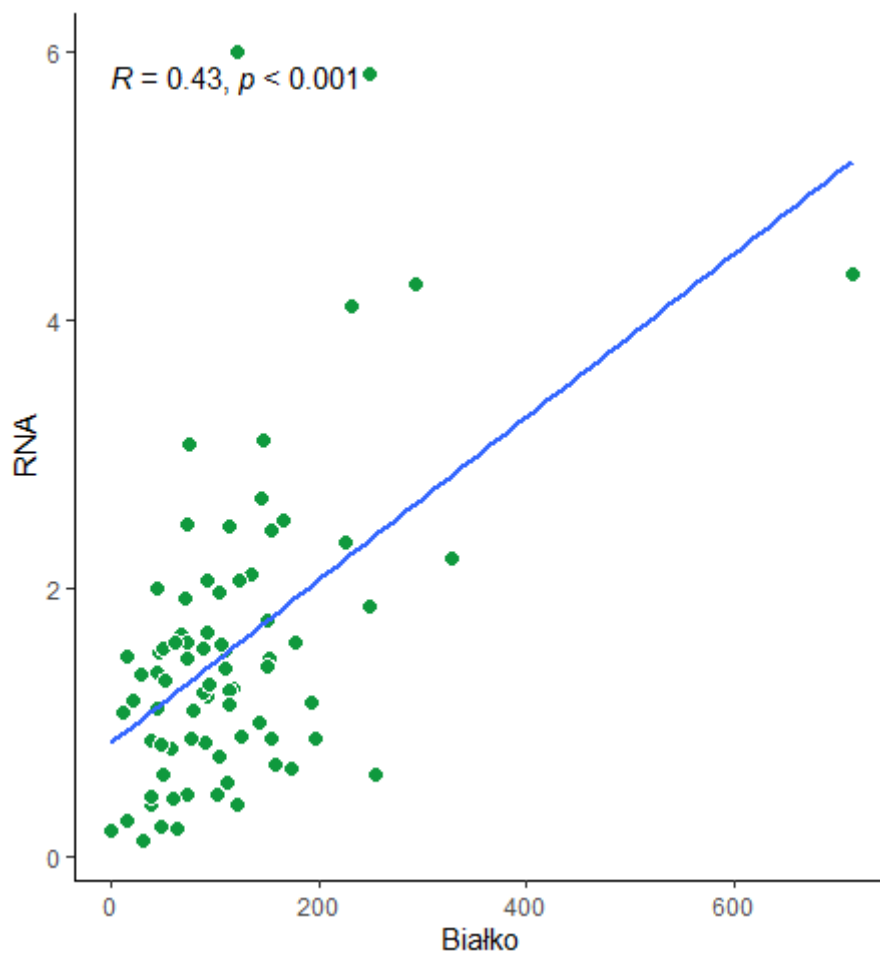
Rysunek 55. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP1A1*.

Na rysunku 55. przedstawiono korelację pomiędzy ekspresją mRNA i stężeniem białka *CYP1A1*. Każdy punkt danych reprezentuje parę wartości dla stężenia mRNA i białka i są one naniesione na płaszczyznę kartezjańską (na tym i kolejnych wykresach). Na rysunku przedstawiono dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA i białka dla genu *CYP1A1*, o dużej istotności ($p < 0.001$) współczynnika R korelacji Spearmana (0,63).



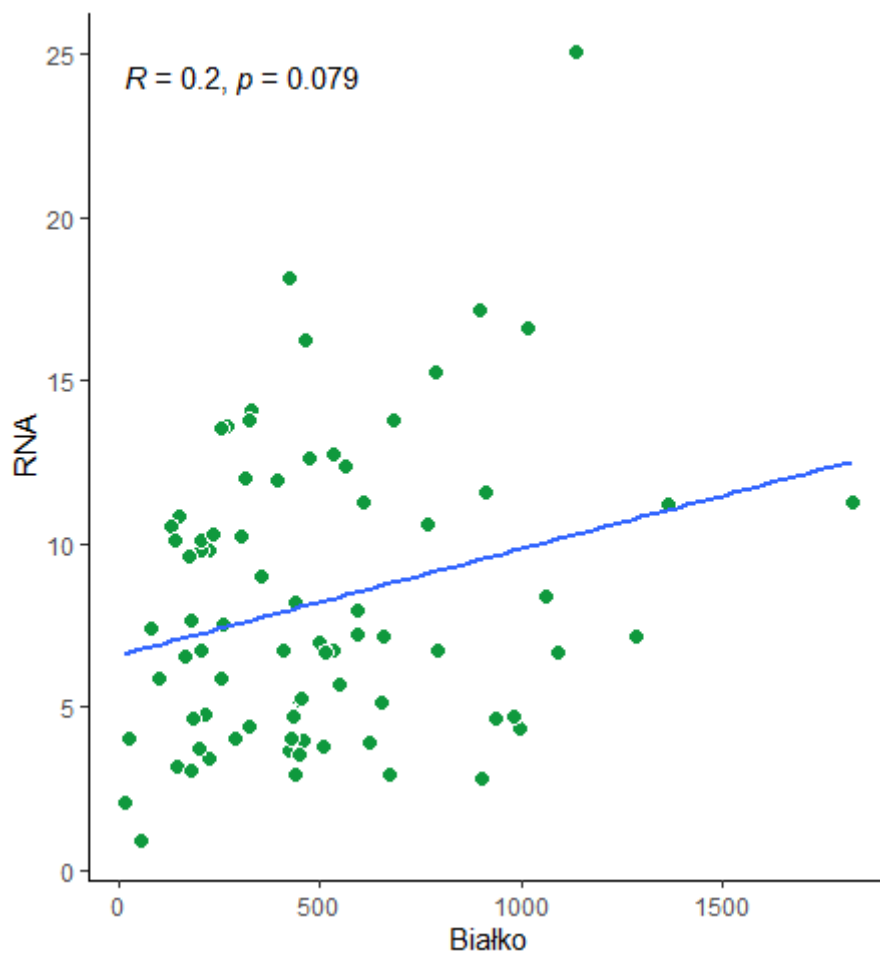
Rysunek 56. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP1A2*.

Na rysunku 56. przedstawiono korelację pomiędzy ekspresją mRNA i stężeniem białka *CYP1A2*. Wykazano silną, dodatnią korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA i białka dla genu *CYP1A2*, charakteryzującą się dużą, istotnie statystycznie ($p < 0.001$) wartością dodatnią (0,72) współczynnika R korelacji Spearmana.



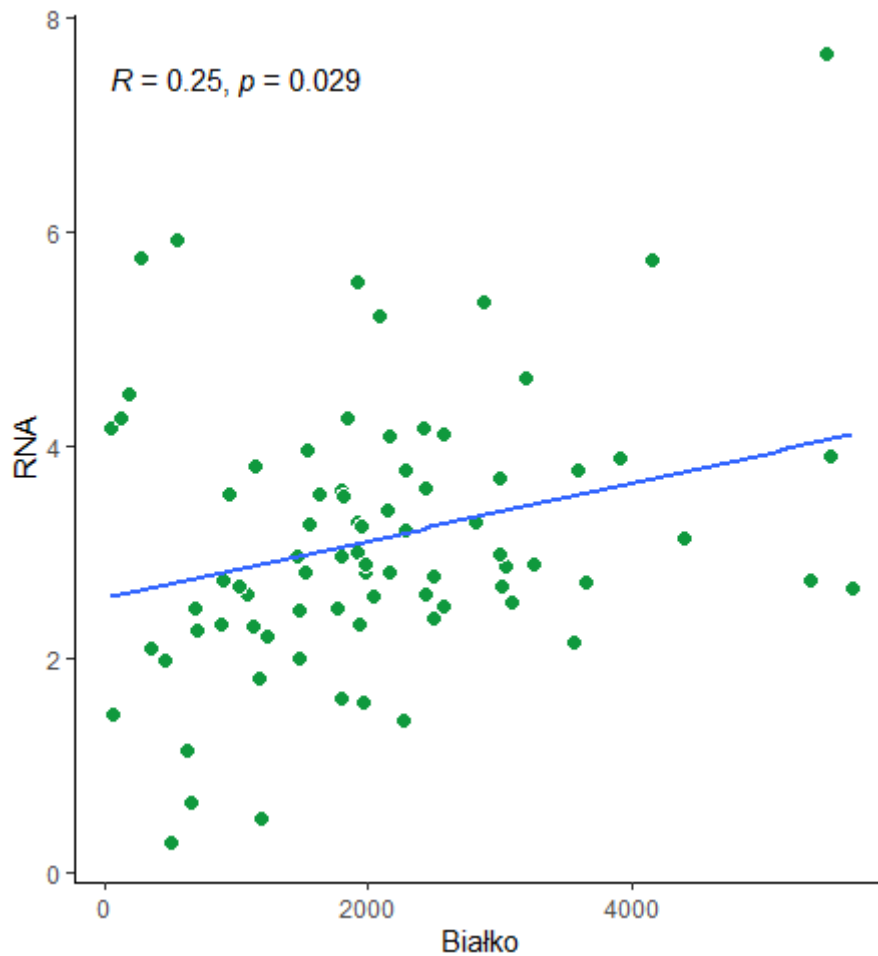
Rysunek 57. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2B6*.

Na rysunku 57. przedstawiono korelację pomiędzy ekspresją mRNA i stężeniem białka w genie *CYP2B6*. Na rysunku przedstawiono umiarkowanie silną korelację pomiędzy poziomem ekspresji mRNA i białka dla genu *CYP2B6*, charakteryzującą się istotnie statystyczną ($p < 0.001$) wartością dodatnią (0,43) współczynnika R korelacji Spearmana.



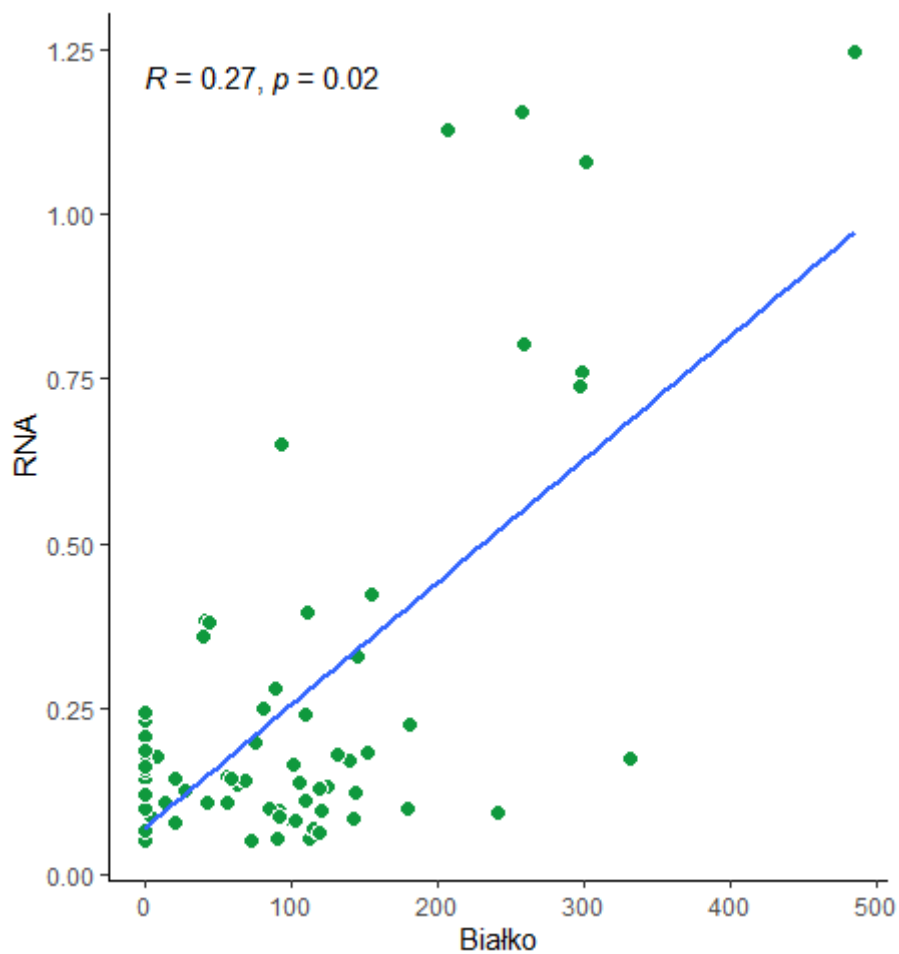
Rysunek 58. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C8*.

Wykres (rysunek 58) przedstawia korelację między poziomem ekspresji mRNA, a stężeniem białka dla genu *CYP2C8*. Wykazano słabą, pozytywną korelację między zawartością mRNA i białka. Obliczając współczynnik korelacji R Spearmana, otrzymano wartość 0,2, co oznacza niewielką pozytywną korelację. Wartość p jest mniejsza niż 0,079, co oznacza, że korelacja jest marginalnie statystycznie istotna.



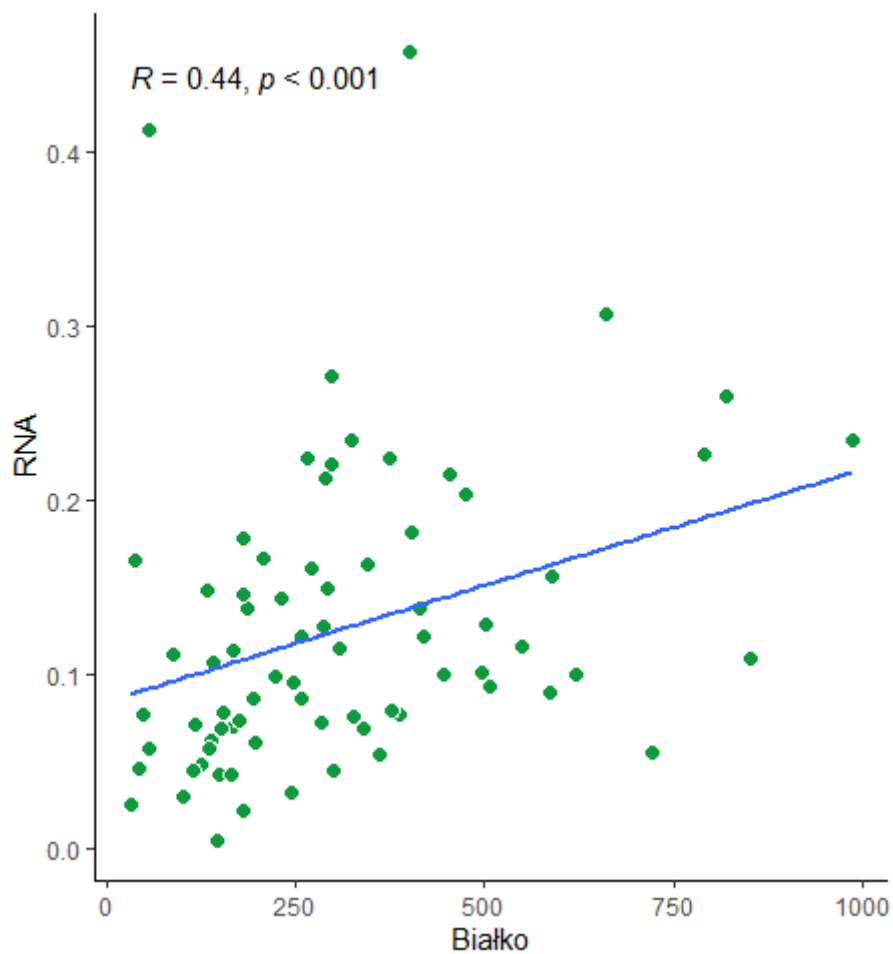
Rysunek 59. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C9*.

Wykres (rysunek 59) przedstawia korelację między poziomem mRNA i zawartością białka dla genu *CYP2C9*. Między poziomem stężeniem mRNA i białka występuje słaba dodatnia korelacja, na co wskazuje wartość R Spearmana wynosząca 0,25. Wartość p mniejsza niż 0,029 wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



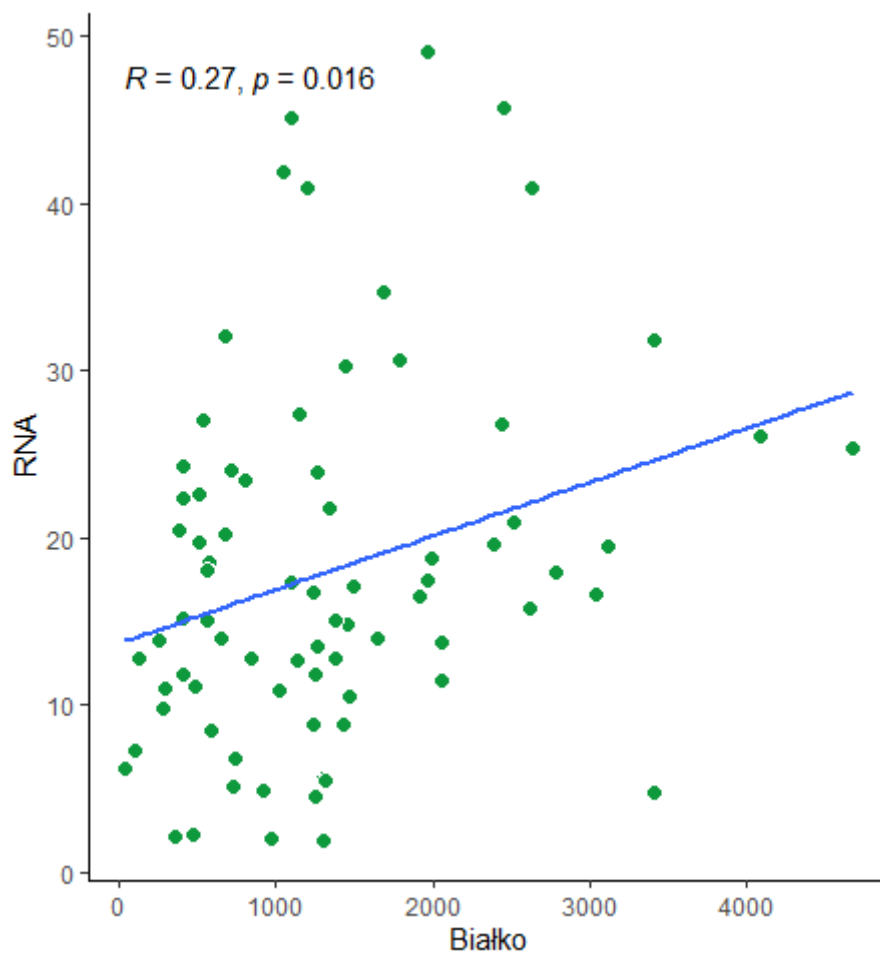
Rysunek 60. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C19*.

Wykres (rysunek 60) przedstawia korelację między poziomem ekspresji mRNA i zawartością białka dla genu *CYP2C19*. Pomędzy poziomem ekspresji mRNA i zawartością białka występuje słaba dodatnia korelacja, co wskazuje wartość R Spearmana wynosząca 0,27. Wartość p, mniejsza niż 0,02, wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



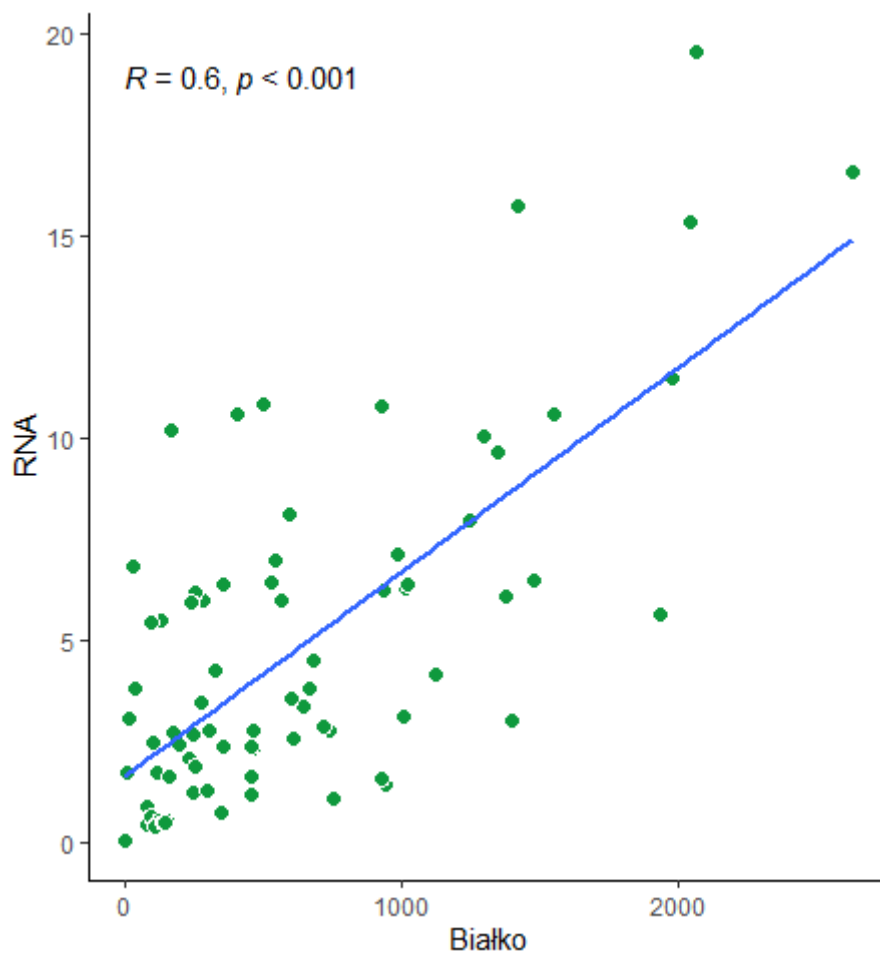
Rysunek 61. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2D6*.

Wykres (rysunek 61) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *CYP2D6*. Między poziomem ekspresji mRNA i białka istnieje pozytywna korelacja. Wartość R Spearmana, wynosząca 0,44, wskazuje na umiarkowaną korelację, a wartość p, mniejsza niż 0,001, wskazuje, że ta korelacja jest istotna statystycznie.



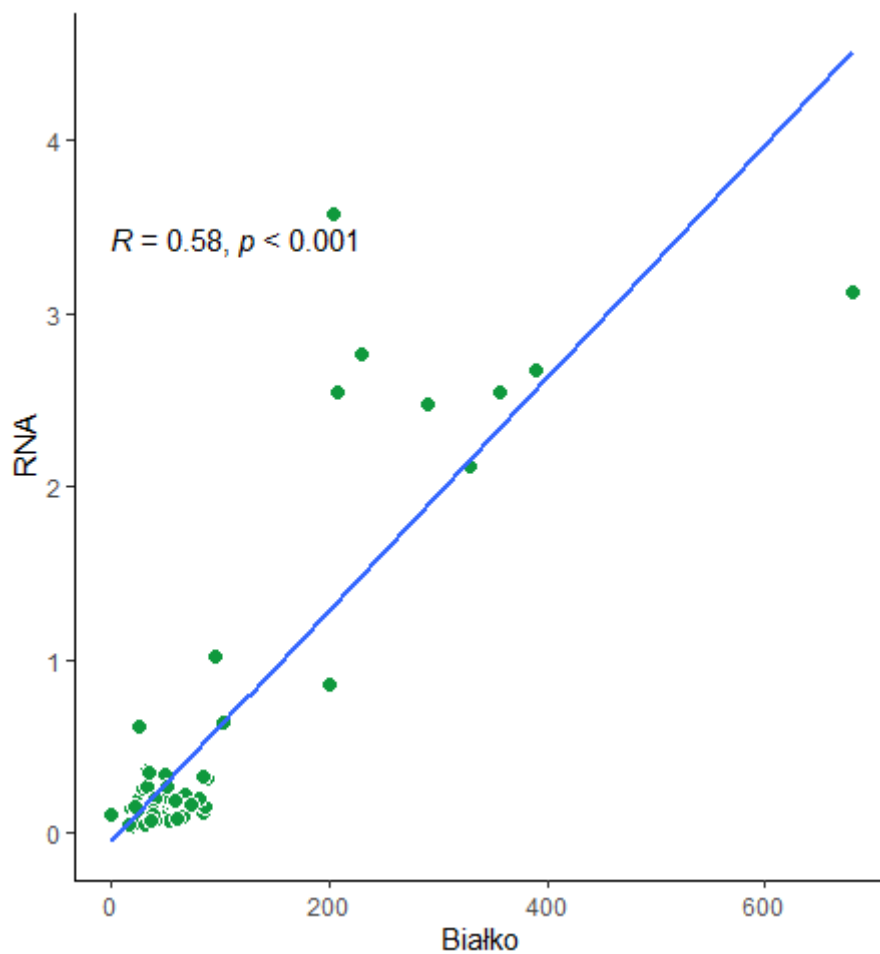
Rysunek 62. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2E1*.

Rysunek 62 przedstawia korelację między poziomem mRNA i zawartością białka dla genu *CYP2E1*. Między stężeniem mRNA i białka występuje słaba dodatnia korelacja, co wskazuje wartość R Spearmana wynosząca 0,21. Wartość p mniejsza niż 0,016 - wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



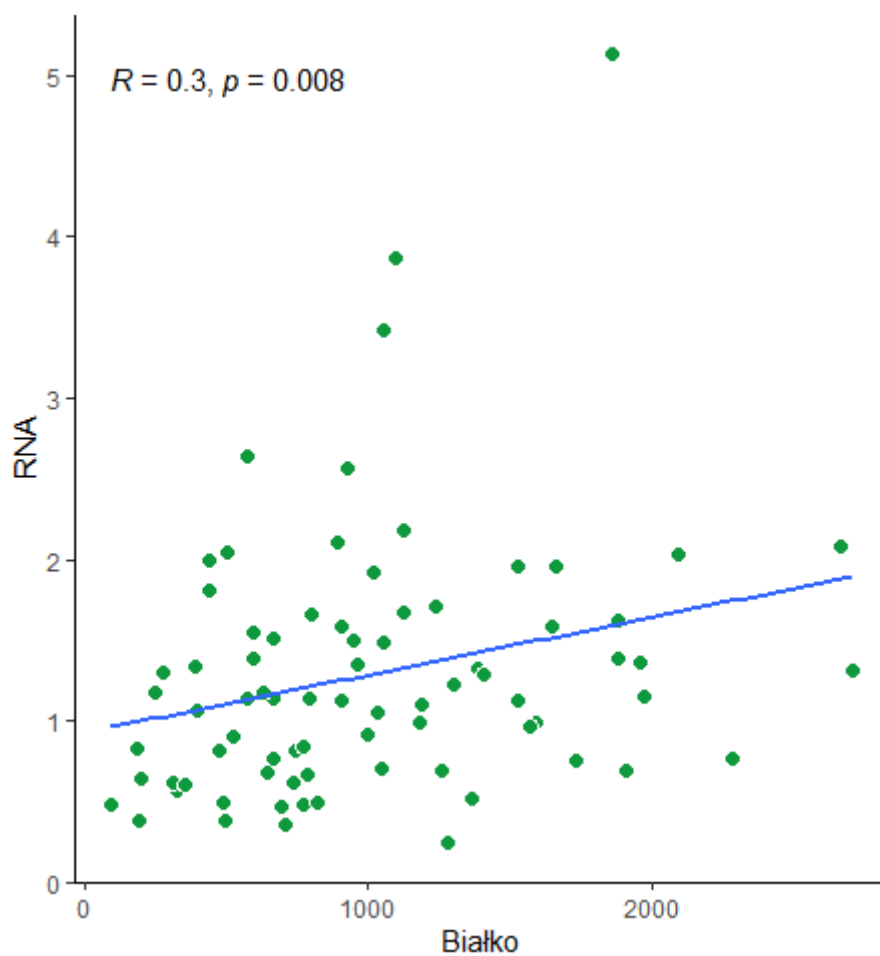
Rysunek 63. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP3A4*.

Wykres (rysunek 63) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *CYP3A4*. Między stężeniem mRNA i białka występuje dość silna dodatnia korelacja, na co wskazuje wartość R Spearmana wynosząca 0,6. Wartość p, mniejsza niż 0,001, wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



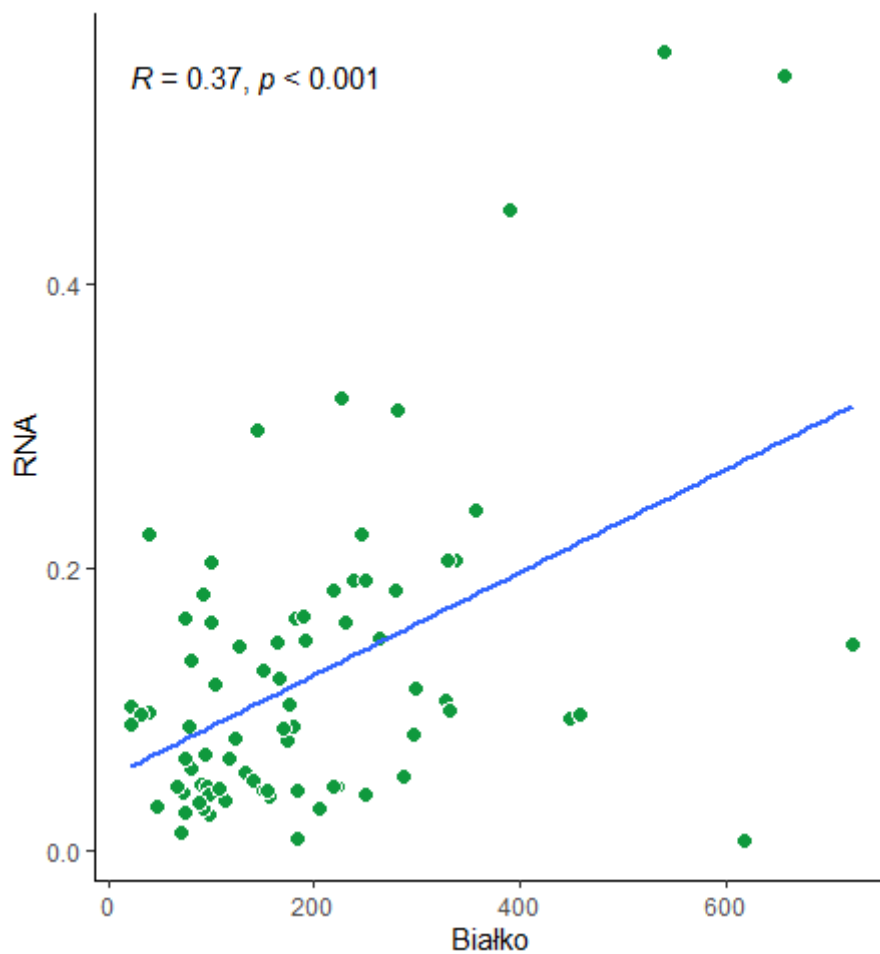
Rysunek 64. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP3A5*.

Wykres (rysunek 64) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *CYP3A5*. Wykazano umiarkowaną, dodatnią korelację między stężeniem mRNA i zawartością białka, co potwierdza wartość R Spearmana, wynosząca 0,58. Wartość p, mniejsza niż 0,001, wskazuje, że ta korelacja jest silnie istotna statystycznie.



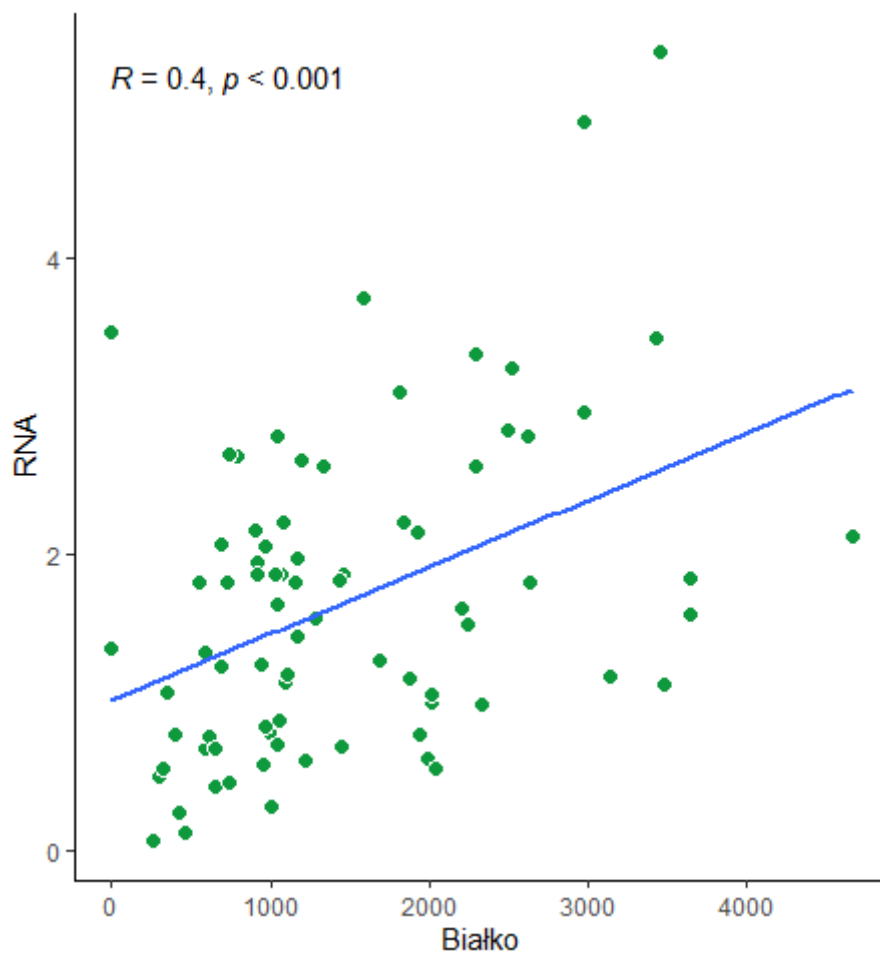
Rysunek 65. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT1A1*.

Wykres (rysunek 65) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *UGT1A1*. Wykazano na dodatnią korelację między stężeniem mRNA i zawartością białka, co potwierdza wartość R Spearmana, wynosząca 0,3. Wartość p, mniejsza niż 0,008, wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



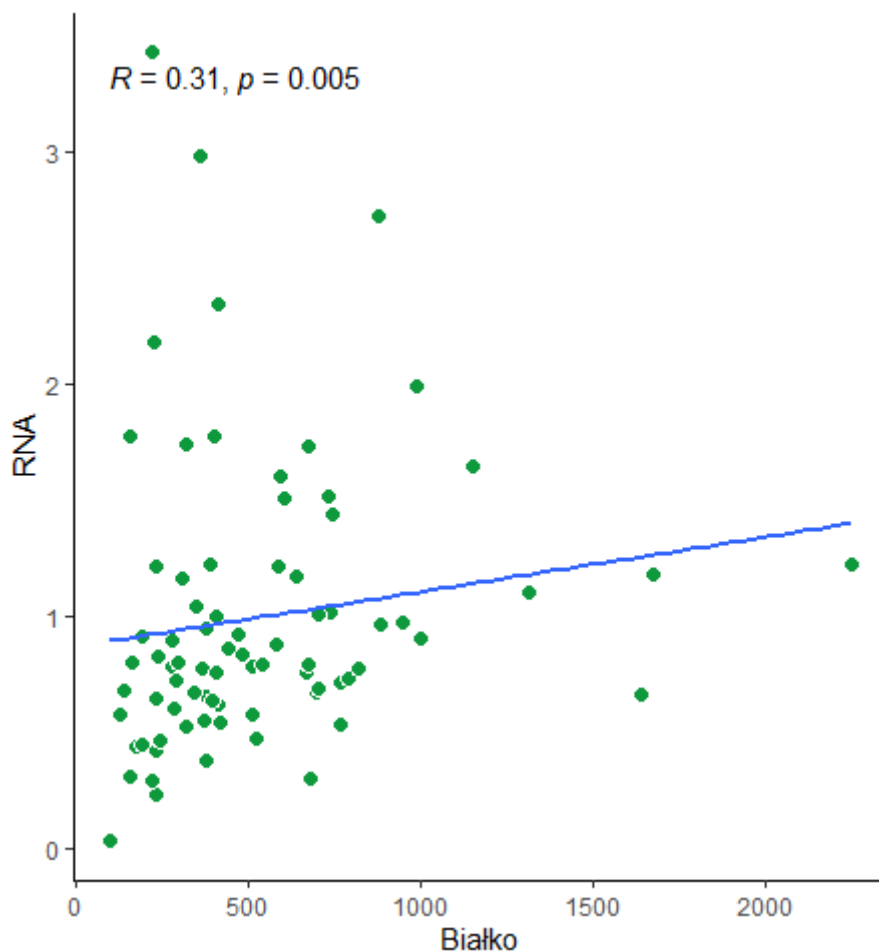
Rysunek 66. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT1A3*.

Wykres (rysunek 66) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *UGT1A3*. Wykazano dodatnią korelację między stężeniami mRNA a zawartością białka, co potwierdza wartość R Spearmana, wynosząca 0,37. Wartość p, mniejsza niż 0,001, wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



Rysunek 67. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT2B7*.

Wykres (rysunek 67) przedstawia korelację między zawartością mRNA i białka dla genu *UGT2B7*. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem mRNA i białka w tym genie, co potwierdza wartość R Spearmana wynosząca 0,4. Wartość p, mniejsza niż 0,001, wskazuje, że ta korelacja jest statystycznie istotna.



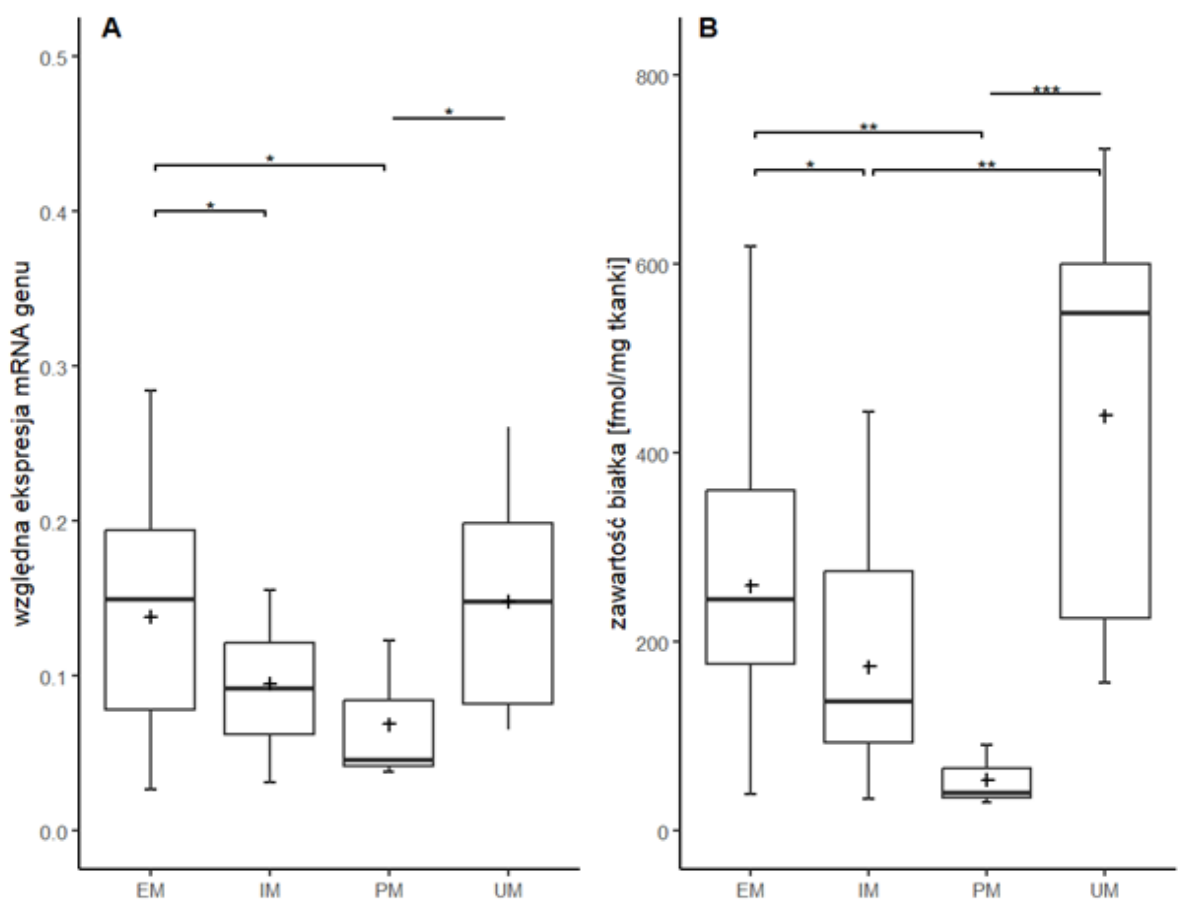
Rysunek 68. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT2B15*.

Wykres (rysunek 68) przedstawia korelację między zawartością mRNA, i białka dla genu *UGT2B15*. Wykazano dodatnią korelację między stężeniem mRNA i zawartością białka, co potwierdza wartość współczynnika korelacji rangowej R Spearmana, wynoszącej 0,31. Wartość p, równa 0,005, wskazuje, że ta korelacja jest istotna statystycznie.

5.3. Analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków oceniona na poziomie mRNA i białka

Na rysunkach 69-71 przedstawiono wyniki analizy, w której badano zależność między wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków (*CYP3A5*, *CYP2C19*, *CYP2D6*) na poziomie mRNA i białka w grupie pacjentów z HCV (n=58). Geny te wybrano do analizy, ponieważ charakteryzują się one obecnością częstych

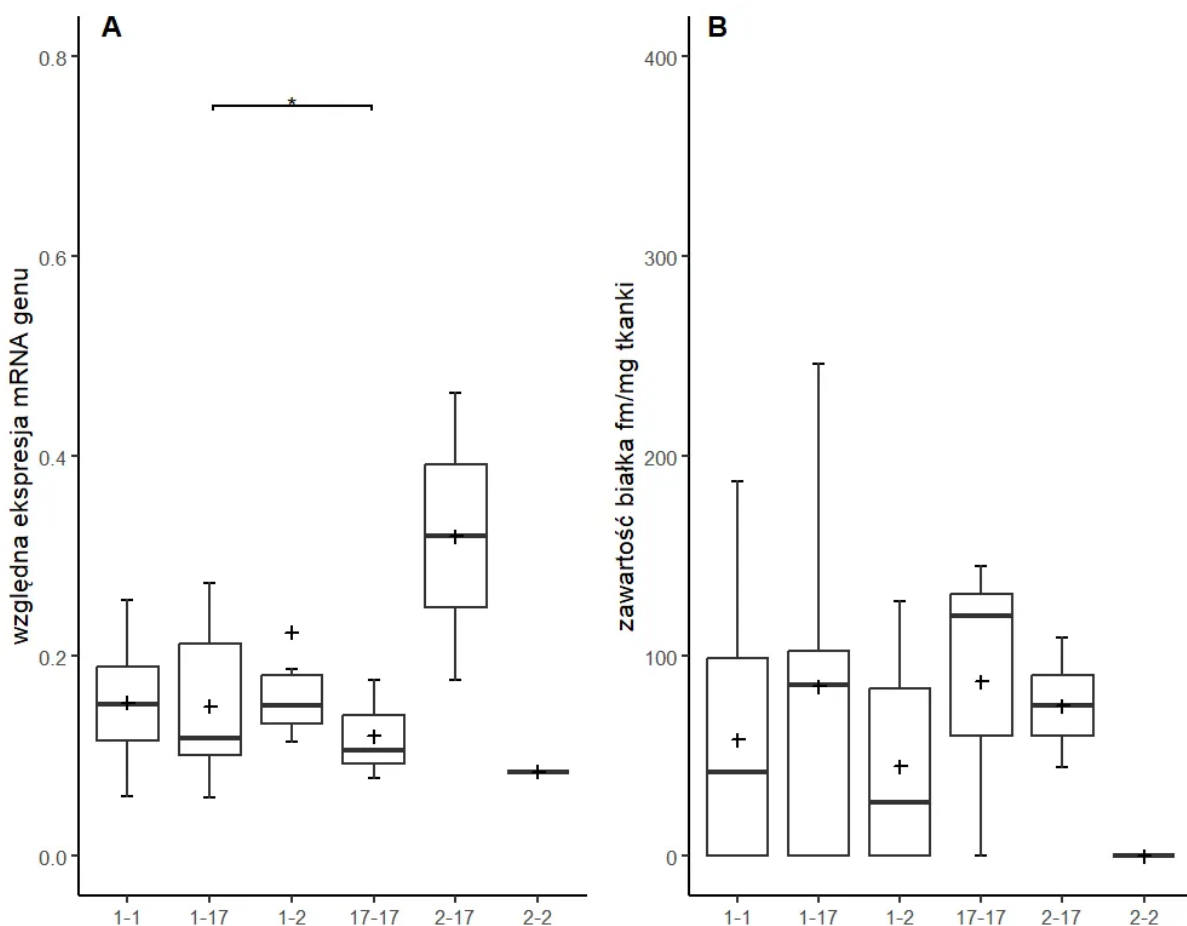
w populacji polskiej wariantów, które mogą wpłynąć na ilość białka, tj. zmian zaburzących składanie mRNA (*splicing defect*), zmieniających ramkę odczytu (*frameshift*) czy też dużych delecji i duplikacji genu. Ponieważ w niniejszej pracy nie badano swoistej aktywności enzymów, w analizie genetycznej nie uwzględniono zmian typu *missense*, obecnych np. w genie *CYP2C9*. W przeprowadzonej analizie zidentyfikowano istotne różnice w ekspresji mRNA i białka między próbkami o różnym genotypie.



Rysunek 69. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu (genetycznie uwarunkowana aktywność enzymu) dla genu *CYP2D6*. EM-extensive metabolizer, IM-intermediate metabolizer, PM-poor metabolizer, UM-ultrarapid metabolizer.

Na wykresie (rysunek 69) przedstawiono ekspresję genu *CYP2D6* mierzoną na poziomie mRNA oraz białka, w zależności od genotypu (EM, IM, PM, UM).

Na potrzeby niniejszej analizy pacjentów podzielono na grupy w zależności od genotypu: EM ($n=26$, *extensive metabolizer*) - pacjenci z dwoma allelami *CYP2D6* typu dzikiego (*1/*1); IM ($n=18$, *intermediate metabolizer*) - pacjenci z jednym allelem typu dzikiego i jednym kodującym enzymem nieaktywny (*1/*3, *1/*4, *1/*5); PM ($n=3$, *poor metabolizers*) - pacjenci z dwoma nieaktywnymi kopiami genu (*3/*4, *4/*4, *4/*5); UM ($n=7$, *ultrarapid metabolisers*) - pacjenci z więcej niż dwoma kopiami aktywnymi genu *CYP2D6* (*1/*1x2). W przypadku ekspresji mRNA (po lewej stronie wykresu) wykazano istotnie mniejszą ekspresję genu dla genotypów IM i PM, w porównaniu do grupy EM. Ekspresja w grupie UM była znacząco wyższa w porównaniu do PM. Genotypy EM i UM charakteryzowały się najwyższą ekspresją mRNA i zawartością białka, genotyp IM pośrednią, a PM - najniższą. W analizie RNA wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami (IM vs EM $p=0,02$, PM vs EM $p=0,004$, PM vs UM $p=0,003$) Wartość p dla porównania UM vs EM wynosiła $p=0,07$. Istotne były również zależne od genotypu różnice w zawartości białka (IM vs EM $p=0,019$, PM vs EM $p=0,026$, IM vs UM $p=0,05$, PM vs UM $p=0,02$), a zawartość białka zwiększała się w grupach wraz ze zwiększającą się liczbą funkcjonalnych kopii genu *CYP2D6* (PM<IM<EM<UM).

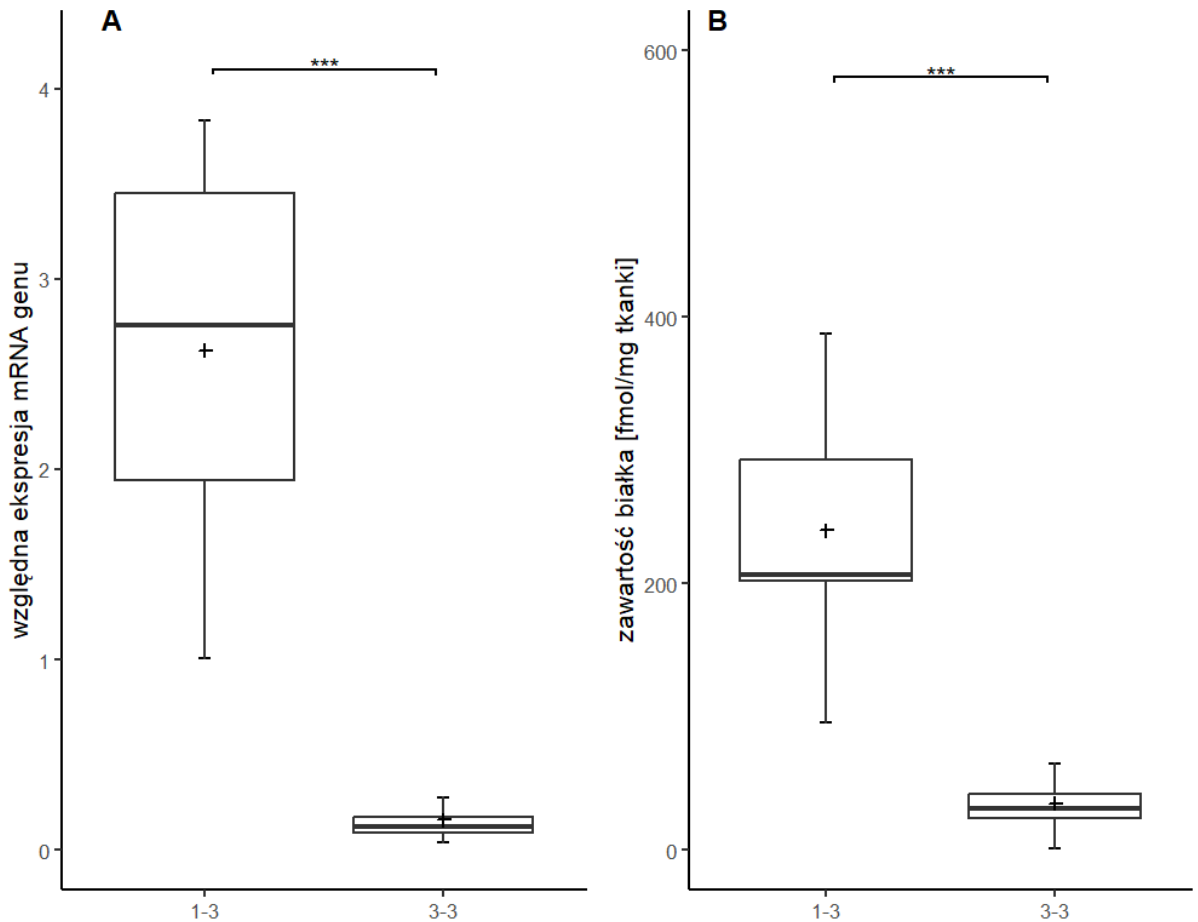


Rysunek 70. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu dla genu *CYP2C19*.

Na wykresie (rysunek 70) przedstawiono ekspresję genu *CYP2C19* mierzoną na poziomie mRNA oraz białka w zależności od genotypu (*1/*1, *2/*17- NM (n=38), *1/*17, *17/*17-EM (n=13), *1/*2, *2/*2- PM (n=4)). Allel *1 koduje enzym o niezmięnionej aktywności, allel *2 związany jest z zaburzeniem składania mRNA (*splicing defect*), a dla allelela *17 stwierdzono podwyższoną aktywność transkrypcyjną [148].

W przypadku ekspresji mRNA wykazano istotne różnice pomiędzy genotypami *1/*17 i *17/*17. Genotypy *1/*17 i *2/*17 charakteryzowały się najwyższą ekspresją mRNA lecz nie najwyższą zawartością białka. W analizie RNA wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy genotypami. *1/*17 oraz *17/*17 ($p=0,027$). Dla genu *CYP2C19* nie stwierdzono genetycznie uwarunkowanych różnic w zawartości białka w wątrobie. Należy zauważyć, że w badanej grupie tylko jeden pacjent charakteryzował się genotypem *2/*2 – genetycznie

uwarunkowanym brakiem aktywności enzymu i dla tego pacjenta stężenie białka było poniżej progu detekcji, natomiast uniemożliwiło to analizę statystyczną genotypu *2/*2.



Rysunek 71. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu dla genu *CYP3A5*.

Na wykresie (rysunek 71) przedstawiono poziom ekspresji mRNA oraz zawartość białka *CYP3A5* dla genotypów: *1/*3 (n=7) (z jedną funkcjonalną kopią genu *CYP3A5*, tzw. *expressers*) i *3/*3 (n=47, brak funkcjonalnej kopii genu, tzw. *non-expressers*). Wyniki analizy jednoznacznie wskazują, że ekspresja genu i zawartość białka dla tego izoenzymu *CYP450* zależą przede wszystkim od czynników genetycznych. Wartość p uzyskana z analizy statystycznej przeprowadzonej pomiędzy genotypami dla ekspresji mRNA wynosiła $2,4 \cdot 10^{-5}$, a dla zawartości białka wynosiła $1,297 \cdot 10^{-8}$.

Uzyskane wyniki badań, zostały opublikowane w dużej części w artykule: Marek Drożdżik, Joanna Łączuk-Romańska, Christoph Wenzel, Łukasz Skalski, Sylwia Szela-

Pieniek, Mariola Post, Arkadiusz Parus, Marta Syczewska, Mateusz Kurzawski, Stefan Oswald. *Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers*. Int. J. Mol. Sci. 24, 4543. 2023. W pracy tej nie przedstawiono wszystkich wyników badań genetycznych, zawartych w niniejszej rozprawie.

6. DYSKUSJA

Dzięki rozwojowi medycyny i nauk pokrewnych, obecnie wiele chorób infekcyjnych, niegdyś stanowiących w znakomitej większości śmiertelne zagrożenie dla życia człowieka, obecnie zostało wyeliminowanych lub ich występowanie zostało znacząco ograniczone. Rozwój poszczególnych dziedzin nauki umożliwił z jednej strony zidentyfikowanie zagrożenia i dokładne zbadanie dróg jego rozprzestrzeniania (jak na przykład wiedza dotycząca budowy i funkcji wirusów), a z drugiej doprowadził do wdrożenia odpowiednich działań w kontrze do zagrożenia (leczenie farmakologiczne, działania prewencyjne).

Jednym z groźniejszych niebezpieczeństw zdrowotnych obecnych czasów, z którym nadal zmagają się świat nauki, jest zakażenie wirusem HCV i jego następstwa. Wiadomym jest, że w trakcie rozwoju zapalenia wątroby dochodzi do zaburzenia funkcji działania tego narządu, co z kolei ma wpływ na farmakokinetykę wielu leków, a co za tym idzie na skuteczność leczenia i bezpieczeństwo zastosowanej terapii farmakologicznej. Ze względu na kwestie etyczne i techniczne, związane z prowadzeniem badań klinicznych, informacje na temat biotransformacji leków w stanach patologicznych wątroby są nieliczne, a te, które zostały opublikowane wymagają dalszego poszerzania.

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest małym wirusem RNA, wykazującym tropizm do komórek hepatocytarnych. Po zakażeniu tych komórek, wirus replikuje się i lokalnie wywołuje odpowiedź immunologiczną, która ostatecznie uszkadza wątrobę, prowadząc do rozwoju marskości i/lub raka wątrobowokomórkowego [146].

W ostatniej dekadzie, nastąpił znaczny postęp w rozwoju nowych opcji leczenia HCV, szczególnie w konsekwencji opracowania i rejestracji bezpośrednio działających leków przeciwwirusowych (DAA). Te innowacyjne leki spowodowały znaczną poprawę wyników farmakoterapii pacjentów z HCV. Skuteczność tych leków nadal jednak, w dużej mierze, zależy od genotypu wirusa HCV, a duża szybkość replikacji wirusa (w połączeniu z częstym

pojawianiem się kolejnych mutacji), znacząco wpływa na niekorzyść nowych form terapii [146]. Wiadomo, że bezpośrednio działające leki przeciwwirusowe, dostępne obecnie w leczeniu zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C są metabolizowane przez enzymy zlokalizowane głównie w wątrobie i jelicie. DAA stanowią substraty różnych izoenzymów układu cytochromu P450, w tym CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19 i CYP3A4, czy CYP3A5. Do leków będących substratami tych enzymów należą między innymi: pibrentaswir, welpataswir, dasabuwir, simeprewir, glecaprewir, grazoprewir, woksilaprewir, czy elbaswir [150].

Oprócz tego, że wymienione powyżej leki mogą stanowić substraty dla tych enzymów, niektóre z DAA wykazują również aktywność hamującą wobec tych enzymów, co sprawia, że wzajemne oddziaływanie między enzymem, substratem i inhibitorem jest bardziej złożone. Na przykład glecaprewir, pibrentaswir, asunaprewir, daklataswir, dasabuwir, elbaswir, grazoprewir, paritaprewir, simeprewir i welpataswir zostały zidentyfikowane jako inhibitory enzymatyczne. Ponadto stwierdzono, że glecaprewir i pibrentaswir hamują enzym UGT1A1 [154, 155].

Identyfikacja enzymów biorących udział w metabolizmie DAA jest kluczowa dla zrozumienia interakcji lekowych, które mogą wystąpić podczas leczenia. Ponadto aktywność hamująca niektórych DAA wobec tych enzymów może mieć również istotne implikacje kliniczne i powinna być brana pod uwagę przy wyborze schematu leczenia zakażenia HCV [152-154].

Według dostępnych informacji o antywirusowych produktach leczniczych (dla niektórych DAA) istnieją ograniczone informacje dotyczące ich bezpieczeństwa i skuteczności u pacjentów z umiarkowanym lub ciężkim upośledzeniem czynności wątroby spowodowanym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C (skala B lub C w skali Childa-Pugha). Powodem tego są przede wszystkim obawy etyczne i wyzwania metodologiczne związane z prowadzeniem badań wśród pacjentów z bardziej zaawansowanym stopniem choroby [20].

Organy regulacyjne, takie jak Europejska Agencja Leków (EMA) oraz Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA), zalecają jednak prowadzenie badań farmakokinetycznych u pacjentów z upośledzoną czynnością wątroby, gdy istnieją powody, by sądzić, że zaburzenia czynności wątroby mogą istotnie wpływać na farmakokinetykę leku, szczególnie w odniesieniu do tempa ich metabolizmu. [20, 21]. Dlatego też, choć

bezpieczeństwo i skuteczność DAA u pacjentów zakażonych HCV z umiarkowanymi lub ciężkimi zaburzeniami czynności wątroby nie zostały w pełni zbadane, organy regulacyjne zalecają przeprowadzenie badań farmakokinetycznych w tych grupach, aby ocenić potencjalny wpływ zaburzeń czynności wątroby na metabolizm leków, dzięki czemu będzie można uzyskać pełniejsze informacje na temat stworzenia zaleceń dotyczących indywidualnego dawkowania. Takie podejście zapewni możliwość optymalizacji leczenia u pacjentów z upośledzoną czynnością wątroby, przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka wystąpienia zdarzeń niepożądanych [20, 21]. Dane ilościowe dotyczące zawartości i aktywności enzymów metabolizujących leki, w wątrobach pacjentów zakażonych HCV, mogą być kluczowe dla podejmowania decyzji klinicznych. Dodatkowo, badania farmakogenetyczne mogą pomóc w przewidywaniu potencjalnych zagrożeń związanych ze zmienioną farmakokinetyką podawanych leków, biodostępnością leków w jamie ustnej oraz interakcjami pomiędzy samymi lekami. Badania te mogą być użyteczne nie tylko w przypadku leków skierowanych przeciwko HCV, ale także innych leków, które pacjenci z HCV przyjmują z powodu chorób towarzyszących [155].

Analiza przeprowadzona w niniejszej pracy wykazała, że pogarszająca się funkcja wątroby wiąże się ze znacznym zmniejszeniem stężenia białka CYP2E1 w klasie A, obniżeniem CYP3A4 i UGT2B7 począwszy od klasy B, a zawartość CYP1A2, CYP2C8 i CYP2C9 była zredukowana w wątrobach z wynikiem C w klasyfikacji Childa-Pugha. Wyniki te sugerują, że na stężenie białka enzymów metabolizujących leki, wpływa zarówno występowanie patologii wątroby, jak i stan funkcjonalny narządu. Badanie to pokazuje również znaczenie uwzględnienia klasyfikacji Childa-Pugha w podejmowaniu decyzji klinicznych u pacjentów z WZW C [155].

Niniejsza analiza stanowi kontynuację i dopełnienie wcześniejszych badań, prowadzonych w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej PUM w Szczecinie, dotyczących wątrobowych transporterów leków u pacjentów z zakażeniem HCV [155,156]. Zrozumienie statusu proteomicznego w wątrobie może być kluczowe w przewidywaniu wpływu patologii wątroby na farmakokinetykę leków, a także potencjalnych odpowiedzi terapeutycznych i działań niepożądanych. Ponieważ, jak wykazano w niniejszej pracy, zawartość mRNA i białka nie zawsze są ściśle skorelowane w przypadku infekcji HCV, wiarygodne informacje o ilości białka zapewniają bardziej precyzyjne przewidywanie aktywności enzymatycznej, niż dane o ekspresji mRNA. Potwierdzają to wcześniejsze badania, z których wynika, że istnieje rozbieżność między ekspresją genu enzymów metabolizujących

leki, a zawartością białka w różnych patologiach wątroby, w tym w uszkodzeniu wątroby wywołanym przez wirusy, alkoholowej chorobie wątroby, autoimmunologicznym zapaleniu wątroby, pierwotnym żółciowym zapaleniu dróg żółciowych i pierwotnym stwardniającym zapaleniu dróg żółciowych [155].

Obecnie istnieje ograniczona liczba opublikowanych informacji na temat danych proteomicznych enzymów metabolizujących leki w odniesieniu do chorób wątroby. Jak obserwowano w cytowanej powyżej pracy [155], różne patologie wątroby miały różny wpływ na zawartość enzymów I i II fazy metabolizmu leków. Próbkę wątroby od pacjentów z HCV, badane wcześniej w Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej (które obejmowały 21 próbek, użytych we wspomnianej analizie) wykazały, że choroba była związana ze znacznym spadkiem stężenia białek CYP2E1, CYP3A5 i UGT2B7, podczas gdy poziomy CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A3 i UGT2B15 pozostały niezmienione. Wyniki te w dużej mierze potwierdzają ustalenia obecnego badania, ale analiza większej liczby przypadków (n=58) ujawniła również znaczące zmniejszenie stężenia białek w CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 i UGT2B15, a także wyraźne zwiększenie zawartości UGT1A1. Wyniki te są zgodne z analizą proteomiczną (LC-MS/MS) przeprowadzoną przez Prasada i wsp. [145], w której stwierdzono niezmienny poziom CYP2D6, ale zanotowano niższe w porównaniu do kontroli zawartości CYP1A2, CYP2E1, UGT2B7 i UGT2B15 w 30 próbkach wątroby pobranych od pacjentów z HCV. Obserwowane różnice w wynikach niniejszej pracy i badania Prasada i wsp. mogą wynikać z różnic metodologicznych lub analizy tkanek wątroby pochodzących od pacjentów o różnym stopniu zaawansowania choroby wątroby wywołanej przez HCV, która nie została zdefiniowana w badaniu Prasada i wsp. [145]. Ponadto informacje przedstawione w obecnym badaniu są komplementarne z ustaleniami dotyczącymi transporterów leków w wątrobie u pacjentów zakażonych HCV, ponieważ do analizy włączono te same osoby [145]. Status proteomiczny enzymów metabolizujących leki w wątrobie, zarówno w stanie zdrowia, jak i niewydolności tego narządu dostarcza danych na temat potencjalnego wpływu patologii wątroby na farmakokinetykę leków, odpowiedź terapeutyczną i potencjalne działania niepożądane.

Niniejsze badanie dodaje nowe informacje dotyczące zmian w zawartości enzymów metabolizujących leki w wątrobach zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C, które są zależne od stadium czynnościowego narządu, sklasyfikowanego według skali Childa-Pugha. Wyniki niniejszego badania pokazały, że w miarę postępu dysfunkcji wątroby dochodzi do

stopniowej ujemnej regulacji enzymów systemu metabolizującego leki. W badaniu Frye R. et al. [146], w którym raportowano wybiórczą modulację metabolizmu mediowanego przez cytochrom P450 w różnych chorobach wątroby, zmiany w stężeniu białek metabolizujących leki były znaczne, w większości przypadków wykazując ponad dwukrotne zmniejszenie zawartości, co może mieć istotne znaczenie kliniczne. Jest to zgodne z wynikami obecnego badania, które jedynie w przypadku UGT1A1 wykazało znaczące zwiększenie zawartości w wątrobach klasy A wg Childa-Pugha, natomiast istotnie zmniejszoną zawartość licznych pozostałych enzymów: CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4, UGT1A3 i UGT2B7 w wątrobach klasy B oraz CYP1A2 i UGT2B7 w wątrobach klasy C. Jednakże, w badaniu Frye et al. nie dokonano oceny stężenia enzymów metabolizujących leki w poszczególnych klasach niewydolności wątroby (A, B, C) według skali Childa-Pugha. W badaniu tym, aktywność wszystkich enzymów była znacząco mniejsza w porównaniu z kontrolą, a pacjentów podzielono na dwie (a nie trzy) grupy: z łagodną niewydolnością oraz średnio-zaawansowaną i zaawansowaną łącznie (A oraz B+C). Łącząc informacje z obu prac (niniejszej i cytowanej), można uzyskać szerszy obraz stanu enzymów metabolizujących leki, co może pomóc w wyjaśnieniu obserwowanych zmian w farmakokinetyce leków u pacjentów zakażonych HCV. Uzyskane w toku niniejszej pracy ilościowe dane proteomiczne są zgodne z informacjami na temat zmienionej aktywności enzymatycznej u pacjentów z chorobami wątroby, np. niższą (o 40%) aktywnością metaboliczną wobec chlorzoksazonu (substratu CYP2E1) u pacjentów z umiarkowanie ciężką chorobą wątroby, czy też znacznie niższą (o 69%) aktywnością metaboliczną wobec kofeiny (substrat CYP1A2) w zdekompensowanej chorobie wątroby (i brakiem zmian farmakokinetyki kofeiny w skompensowanej chorobie). Z tej perspektywy, wyniki obecnego badania są zgodne z danymi klinicznymi dotyczącymi wartości współczynników metabolicznych dla substratów badanych enzymów (czyli, CYP1A2, CYP2C19 i CYP2E1) [146].

Wyniki niniejszego badania dotyczące aktywności enzymu CYP3A4 są zgodne z obserwacjami klinicznymi dotyczącymi farmakokinetyki midazolamu, który jest substratem CYP3A4. W szczególności, Pentikäinen i wsp. w pracy na temat: farmakokinetyki midazolamu u pacjentów z przewlekłą chorobą wątroby stwierdzili, że pacjenci z przewlekłą chorobą wątroby (o nieokreślonej etiologii) mieli istotnie wyższą doustną biodostępność (o 38%) i niższy klirens całkowity leku (o 41%), pomimo braku zmian w wiązaniu z białkami osocza i dystrybucji [155]. Wyniki te pokrywają się z wynikami niniejszego badania.

Niniejsza analiza wykazała również znaczący wzrost stężenia białka UGT1A1 w wątrobach klasy A wg Childa-Pugha, co nie jest zgodne z wynikami badań Prasada i wsp. [145]. Tamto badanie wykazało, że poziom UGT1A1 był poniżej dolnej granicy oznaczalności w wątrobach zakażonych HCV. Wyniki niniejszej pracy są jednak zgodne z obserwacją dotyczącą zmian w ekspresji genów opisanymi przez Congiu i wsp. [158], którzy stwierdzili wyższy poziom UGT1A1 we wczesnych stadiach zwłóknienia wątroby, ale istotnie mniejszą ekspresję w bardziej zaawansowanych stadiach choroby. Co ciekawe, w niniejszej pracy wykazano, że poziomy ekspresji mRNA UGT1A1 w wątrobie były podobne we wszystkich klasach Childa-Pugha. Kliniczne badania farmakokinetyczne sugerują, że choroby wątroby zwykle nie wpływają na szlaki glukuronidacji [159], co jest poparte obserwacjami dotyczącymi stabilnych stężeń białek UGT1A3 i UGT1A1 w wątrobach Childa-Pugha klasy B i C HCV. Do większości badań donoszących o zachowaniu glukuronidacji leków rekrutowano jednak pacjentów tylko z łagodną lub umiarkowaną chorobą wątroby. Ostatnie doniesienia sugerują, że niektóre szlaki glukuronidacji mogą być ujemnie regulowane w bardziej zaawansowanych stadiach niewydolności wątroby. Niniejsze badanie wykazało niższe stężenia UGT2B7 i UGT2B15 w wątrobach pacjentów z HCV, szczególnie w wątrobach klasy C Childa-Pugha, w porównaniu do kontroli. Te wyniki mogą tłumaczyć zmniejszoną glukuronidację różnych leków u pacjentów z dysfunkcją wątroby, w tym morfiny (UGT2B7), lamotryginy (UGT1A4, UGT2B7), zidowudyny (UGT2B7), kwasu mykofenolowego (UGT1A9, UGT2B7) i oksazepamu (UGT2B15). Należy zauważyć, że badania *in vivo* z wykorzystaniem wymienionych leków nie umożliwiają oceny wpływu choroby na zawartość i aktywność poszczególnych izoform UGT, ponieważ często obserwuje się udział wielu izoenzymów w metabolizmie tego samego substratu [160-164].

Ponadto w niniejszym badaniu stwierdzono, że wyniki pomiaru stężenia białek enzymów metabolizujących leki w grupie kontrolnej były w większości zgodne z wynikami wcześniejszych doniesień. Warto jednak wspomnieć, że użycie określonych prób wątroby kontrolnej może w pewien sposób wpływać na wyniki, ponieważ w przypadku wielu enzymów metabolizujących leki ekspresja może bardzo różnić się nawet pomiędzy osobami zdrowymi, o tej samej płci, wieku i pochodzeniu etnicznym. Można także przypuszczać, że rodzaj analizowanej próby (cała tkanka wątroby lub frakcja mikrosomalna) wykorzystywanej do analizy proteomicznej [165], jak również proces przechowywania i preparacji tkanek [166], a także różnice w metodyce analizy [167, 168], mogą powodować niespójności w wynikach badań. W niniejszym badaniu wyniki uzyskane dla grupy kontrolnej – prób tkanki

pochodzących z wątrób pacjentów z przerzutującym rakiem jelita, które były wolne od zmian patologicznych, w odniesieniu do większości enzymów (np. CYP2C9, CYP2E1 i CYP3A4) były zgodne z wynikami proteomicznymi uzyskanymi przez Vasilogianni i wsp., którzy dokonali pomiarów we frakcji mikrosomalnej [169].

W celu eliminacji wpływu czynnika etnicznego, do obecnego badania włączono wyłącznie próby wątrób od pacjentów pochodzących z populacji polskiej, nie deklarujących przodków o innym pochodzeniu etnicznym. Dostępne dane literaturowe wskazują, że pochodzenie etniczne może mieć wpływ na farmakokinetykę leków, wskazując pośrednio na różnice w aktywności enzymów metabolizujących leki pomiędzy różnymi populacjami [169]. Niektóre z różnic międzyetnicznych można przypisać polimorfizmom genetycznym, które wpływają na zawartość białka lub aktywność enzymatyczną, np. wyższa częstość alleli związanych z wydajną ekspresją genu *CYP3A5* (*CYP3A53*, *CYP3A56*, i *CYP3A5*7*) u Afroamerykanów w porównaniu z osobami pochodzenia europejskiego, rdzennymi Amerykanami i Azjatami, co wpływa na odmienną farmakokinetykę takrolimusu w poszczególnych grupach pacjentów [170].

Obserwowane zmiany w ekspresji genów i zawartości enzymów metabolizujących leki można przypisać także zmianom wydzielania cytokin wywołanym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C. Zakażenie HCV jest przewlekłą chorobą zapalną, która wiąże się z podwyższonym stężeniem w wątrobie niektórych cytokin, w tym interleukiny-6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworów (TNF) [171]. Badania wykazały, że komórki T naciekające wątrobę pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C produkują interferon-gamma (IFN- γ) [172], a apoptotyczne hepatocyty uwalniają interleukinę-1 alfa (IL-1 α) [173]. Dodatkowo, makrofagi po ekspozycji na HCV wydzielają interleukinę-1 beta (IL-1 β) i interleukinę-18 (IL-18) [174]. Cytokiny te mogą odgrywać rolę w regulacji transkrypcyjnej układu mikrosomalnego wątroby, co mogłoby tłumaczyć zmiany w ekspresji obserwowane w niniejszym badaniu.

Doświadczenia *in vitro* prowadzone z wykorzystaniem hodowli ludzkich hepatocytów wykazały, że ekspozycja na IL-6 skutkuje obniżeniem ekspresji niektórych genów kodujących enzymy cytochromu P450 (np. *CYP3A4* i *CYP2B6*), przy jednoczesnej podwyższonej ekspresji *CYP1A2* [175]. Nie wykazano jednak wpływu IL-1 β , a także nie zaobserwowano synergizmu pomiędzy IL-6 i IL-1 β na ekspresję genów [175]. Komórki HepaRG traktowane IL-6 wykazywały mniejszą ekspresję poziomu mRNA genów *CYP1A2*, *CYP2B6* i *CYP3A4*, co

obserwowano również w pierwotnych hodowlach hepatocytów [176]. Nie zaobserwowano natomiast supresji mRNA *CYP1A2*, *CYP2B6* i *CYP3A4* po ekspozycji na IL-18 i IL-1 β [176,177].

Dodatkowo, w dostępnej literaturze, opisano, że TNF hamuje ekspresję genu *cyp1a1* w linii komórkowej mysich hepatocytów Hepa1c1c7 [178]. Ponadto IFN- γ indukował ujemną regulację ekspresji *CYP1A2* i *CYP3A4* w ludzkich hepatocytach [179]. Wydaje się, że hamowanie aktywności czynników transkrypcyjnych, takich jak czynniki jądrowe hepatocytów (HNFs), czynnik jądrowy-kappa B (NF- κ B), jak również kilku receptorów jądrowych, w tym receptora pregnanu X (PXR) i konstytutywnego receptora androstanu (CAR), może być odpowiedzialne za inhibicję ekspresji CYP przez bodźce zapalne [177, 179, 180]. Stwierdzono, że PXR bierze udział w indukowanym przez IL-6 obniżeniu ekspresji *CYP3A4* w komórkach HepG2 [181], a także wykazano, że IL-1 reguluje *CYP3A4*, przy możliwym udziale HNF4 [45]. Według doniesień Ke S. et al. [178], NF- κ B odgrywa rolę w zmniejszaniu ekspresji *CYP1A1/IA2* w hepatocytach. Dodatkowo, enzymy fazy II w hepatocytach mogą być również regulowane przez PXR i RCA [183, 184].

Wyniki niniejszego badania mogą być wykorzystane do ulepszenia modeli farmakokinetycznych dla DAA, ponieważ dostępne informacje na temat farmakokinetyki DAA u pacjentów z HCV z zaawansowaną chorobą wątroby, szczególnie u tych z klasy C w skali Child-Pugh, są ograniczone. Wyraźnie obniżone zawartości *CYP1A2* (a także *CYP3A4* i *UGT1A1*) mogą odpowiadać za zmienioną farmakokinetykę pibrentaswiru, którego AUC, jak podają w swojej pracy Kosloski M. et al., różniła się o 26% u pacjentów z marskością wątroby klasy A lub B w skali Childa-Pugha w porównaniu z kontrolą i wzrastała do 2,1-krotności u osób z klasą C [185]. Z kolei na zawartość białka *CYP2B6* nie ma wpływu stopień niewydolności wątroby. Jak podają Mogalian i wsp., aksapataswir jest metabolizowany przez ten szlak enzymatyczny (jak również w reakcja katalizowanych przez *CYP2C8* i *CYP3A4*), a na jego farmakokinetykę nie mają wpływu zaburzenia czynności wątroby, co potwierdzają wyniki badań proteomicznych przeprowadzonych w niniejszym badaniu. AUC leku było porównywalne u pacjentów bez HCV Child-Pugh klasy B i C oraz u osób z prawidłową czynnością wątroby [186].

Jak podają Kharti i wsp. [187], zawartość białka *CYP2C8* w próbach od pacjentów zakażonych HCV nie uległa zmianie, podobnie jak w przypadku *CYP2B6*. Enzym ten odgrywa rolę w metabolizmie dasabuwiru (i jak wspomniano wcześniej, welpataswiru). Wartości

AUC dasabuwiru były porównywalne u osób zdrowych i pacjentów z klasą A w skali Childa-Pugha. Jednak u pacjentów z klasą B wg Childa-Pugha zaobserwowano 16% zmniejszenie wartości AUC leku, czemu towarzyszyło zmniejszenie wartości AUC o 57% dla głównego metabolitu. Natomiast pacjenci klasy C wykazywali podwyższone wartości AUC zarówno dla dasabuwiru (o 325%), jak i głównego metabolitu (o 77%). Zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego, dasabuwiru nie należy podawać pacjentom klasy B i C w skali Childa-Pugha. Obserwowane w niniejszej pracy obniżenie zawartości białka CYP2C8 w wątrobie mogłoby częściowo wyjaśniać opisywane wcześniej zmiany w farmakokinetyce leku.

Informacje farmakokinetyczne dotyczące symeprewiru, substratu dla CYP2C19, CYP3A4 i CYP2C8, u pacjentów z zaburzeniami czynności wątroby nie są jednoznaczne. Podczas gdy w niektórych badaniach nie zaobserwowano różnicy w AUC pomiędzy pacjentami klasy A i B Childa-Pugha [188], w innych odnotowano znaczne zwiększenie AUC u pacjentów klasy B i C [189]. Obserwowane zmiany w farmakokinetyce można przypisać ujemnej regulacji CYP3A4, choć nie można wykluczyć innych czynników. Ze względu na przytoczone obserwacje, nie zaleca się stosowania symeprewiru u pacjentów z klasą C w skali Child-Pugh, a u pacjentów z klasą B w skali Child-Pugh należy zachować ostrożność [190].

Podobne zmiany w farmakokinetyce obserwowano w badaniach klinicznych złożonych preparatów elbaswiru/grazoprewiru, glekaprewiru/pibrentaswiru oraz sofosbuwiru/welpataswiru/woksilaprewiru, z których wszystkie są substratami dla CYP3A4. Obecnie nie zaleca się stosowania tych leków u pacjentów w klasie B i C wg Childa-Pugha, ponieważ nie są dostępne odpowiednie dane [191]. Oprócz związanych z chorobą zmian w stężeniach białek enzymów CYP, badanych w niniejszej analizie, na farmakoterapię pacjentów z HCV może wpływać również potencjał inhibicyjny kilku DAA. Należą do nich takie leki, jak glekaprewir, pibrentaswir, asunaprewir, daklataswir, dasabuwir, elbaswir, grazoprewir, paritaprewir, simeprewir i welpataswir, które hamują CYP1A2, CYP3A4/5 i UGT1A1. Niektóre z tych leków są dostępne w kombinacjach o stałej dawce, takich jak elbaswir/grazoprewir lub glekaprewir/pibrentaswir. Dlatego przy konstruowaniu modeli PBPK (ang. *physiologically based pharmacokinetic*) ważne jest uwzględnienie nie tylko zawartości białek CYP, ale także potencjału inhibicyjnego poszczególnych DAA.

Podsumowując, na podstawie dostępnych informacji, dotyczących przeciwwirusowych produktów leczniczych, można ocenić, że brakuje wystarczających danych dotyczących ich

bezpieczeństwa i skuteczności u pacjentów z umiarkowanym lub ciężkim upośledzeniem czynności wątroby, wynikającym z zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (skala B lub C wg Childa-Pugha) [149]. Wynika to w dużej mierze ze względów etycznych, jak również z wyzwań metodologicznych związanych z prowadzeniem badań klinicznych wśród pacjentów z zaawansowanymi stadiami choroby wątroby.

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki badań wyraźnie wskazują na konieczność uwzględniania funkcji wątroby przy przepisywaniu leków, szczególnie pacjentom z niewydolnością wątroby w przebiegu infekcji HCV. Ponieważ zaobserwowano znaczące różnice w stężeniach poszczególnych białek (które można przełożyć na wydajność metabolizmu leków) u pacjentów z różnymi stadiami choroby wątroby, kluczowe znaczenie ma opracowanie zindywidualizowanych planów leczenia uwzględniających takie czynniki, jak czynność wątroby i wszelkie choroby współistniejące u pacjenta [151]. Pozwoliłoby to na optymalizację schematów leczenia, a w konsekwencji także poprawę ogólnych wyników farmakoterapii.

Badania farmakogenetyczne i farmakogenomiczne mają na celu zbadanie związków pomiędzy genetycznymi wariantami a losem leków w organizmie, ich skutecznością i bezpieczeństwem farmakoterapii. Wiele badań wskazuje na związek genotypu z ekspresją genów kodujących enzymy metabolizujące leki oraz aktywnością poszczególnych enzymów [192], przy czym większość dostępnych danych na temat tej zależności pochodzi z obserwacji dotyczących pacjentów z prawidłową funkcją wątroby. W niniejszej pracy przeprowadzono analizę związku wybranych wariantów genów *CYP2D6*, *CYP2C19* i *CYP3A5* z ekspresją genów i zawartością białka w wątrobie pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV.

Wyniki analizy dla genu *CYP2C19* nie wykazały co prawda istotnych, zależnych od genotypu różnic w stężeniu białka tego enzymu, ale u jedyne go włączonego do badania pacjenta z genotypem **2/*2*, zawartość białka była poniżej poziomu detekcji, w przeciwieństwie do większości pozostałych prób wątroby. Co prawda w tym wypadku analiza statystyczna nie była możliwa, jednak obserwacja ta wskazuje, że czynniki genetyczne mogą być dodatkową przyczyną zmienności w zakresie metabolizmu substratów *CYP2C19*, także wśród pacjentów z niewydolnością wątroby. *CYP2C19* jest odpowiedzialny za metabolizm wielu leków, w tym kłopidogrelu i omeprazolu [193]. Co więcej, czynniki genetyczne mogą mieć nawet większe znaczenie w przypadku niewydolności wątroby. Przykładowo, kłopidogrel jest przekształcany do aktywnego metabolitu w dwuetapowej reakcji, przy czym pierwszy etap jest katalizowany

przez CYP2C19, 1A2 i 2B6, a drugi przez CYP2C19, 3A4, 2B6 i 2C9. Genetycznie uwarunkowany niedobór CYP2C19 upośledza aktywację klopidogrelu u wszystkich pacjentów z genotypem *2/*2, ale w przypadku pacjentów z niewydolnością wątroby dodatkowo zmniejszona jest zawartość (i w konsekwencji aktywność) pozostałych enzymów, co dodatkowo zwiększa ryzyko nieskuteczności leku antyagregacyjnego. [28, 37,61]

Wyniki analizy dla genu *CYP2D6* wykazały istotne różnice w ekspresji mRNA i zawartości białka między pacjentami o różnym genotypie (EM, IM, PM i UM). *CYP2D6* jest odpowiedzialny za metabolizm wielu leków, w tym kodeiny, tramadolu, dekstrometorfanu czy metoprololu. [194]. Pacjenci z różnymi genotypami mogą wymagać różnych dawek tych leków, ponieważ ich zdolność do metabolizowania leków jest zmniejszona lub zwiększona w zależności od allelicznej formy genu [19]. Jak wykazano w niniejszej pracy, *CYP2D6* należał do nielicznych izoenzymów CYP450, dla którego zawartość białka w tkance wątrobowej była niezmienną nawet w wątrobach pacjentów w klasie C skali Childa-Pugha. Podobnie jak to opisano w przypadku CYP2C19, tutaj również czynniki genetyczne mogą być szczególnie istotne w przypadku pacjentów z niewydolnością wątroby. Pacjent z genetycznie uwarunkowanym niedoborem *CYP2D6* będzie się bowiem charakteryzował obniżonym stężeniem i aktywnością większości enzymów (z powodu niewydolności wątroby) oraz dodatkowo brakiem jednego z niewielu enzymów, którego zawartość pozostaje zwykle zachowana w przebiegu choroby. Może to w konsekwencji wpłynąć na jeszcze bardziej zmienioną farmakokinetykę wielu leków, w tym wymienionych powyżej beta-adrenolityków, leków opioidowych czy przeciwkaszlowych.

Wyniki analizy dla genu *CYP3A5* wykazały również istotne różnice w ekspresji mRNA i białka między genotypami *1/*3 i *3/*3, co potwierdza zasadnicze znaczenie polimorfizmu genetycznego w przypadku tego genu. *CYP3A5* bierze udział w metabolizmie wielu leków, w tym cyklosporyny i takrolimusu, jego swoistość substratowa w dużej mierze pokrywa się z *CYP3A4*. W wielu populacjach (w tym w polskiej) przeważająca większość osób charakteryzuje się brakiem aktywności enzymu, głównie z powodu obecności dwóch niefunkcyjnych alleli *3. W przypadku *CYP3A5* sytuacja jest więc odmienna niż w przypadku pozostałych enzymów układu CYP450 – to aktywność enzymu (a nie jej brak) jest w pewnym ujęciu cechą szczególną. Pacjenci z genotypem *1/*3 mogą wymagać wyższej dawki leków będących substratami *CYP3A5* w porównaniu z pacjentami z genotypem *3/*3, ponieważ ich zdolność do metabolizowania tych leków jest zwiększona [68]. Wariant *CYP3A5* (*3) jest związany z defektem składania mRNA (ang. *splicing defect*), co prowadzi do szybszej

degradacji RNA i braku aktywnego białka. Zastosowana metoda MS wykrywa białko, ponieważ badany peptyd jest zlokalizowany przed SNP-em powodującym defekt splicingu i zmianę dalszej sekwencji białka. To oznacza, że sekwencja peptydu, która jest wykrywana przez MS, jest wciąż obecna w skróconym i нефункциональным białku, pomimo zmiany genetycznej. Także użyta do badań RNA sonda typu TaqMan wykrywała sekwencję genu, ponieważ sekwencja rozpoznawana przez sondę i startery jest zlokalizowana przed SNP-em (6986A>G) powodującym defekt splicingu i zmianę dalszej sekwencji RNA [188]. Wyniki wskazują jednak, że w przypadku allele *3, zarówno mRNA jak i нефункциональное białko są prawdopodobnie znacznie mniej stabilne niż w przypadku *1, co wiązało się z ich znacznie mniejszymi stężeniami w tkance (ok. 10-krotnie w przypadku białka).

Podsumowując, badania genetyczne są dobrym uzupełnieniem wyników analizy ekspresji genów i zawartości białka enzymów metabolizujących leki. Warianty genetyczne mają wpływ na mierzone wartości i powinny być uwzględniane w kolejnych analizach proteomicznych czy też dotyczących aktywności enzymów, zarówno w populacji osób z prawidłową funkcją wątroby, jak i w przypadku pacjentów z niewydolnością tego organu.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania dotyczące enzymów metabolizujących leki mogą być użyteczne w tworzeniu modeli farmakokinetycznych i potencjalnie wykorzystane w procesie wdrażania działań z zakresu medycyny spersonalizowanej, co ostatecznie może prowadzić do poprawy strategii leczenia pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV, co dotyczy zarówno farmakoterapii przeciwwirusowej, jak i chorób współistniejących w tej grupie pacjentów. Część danych może być przydatna do metaanaliz i ekstrapolowana także na choroby wątroby o innej niż HCV patogenezie. Aby jednak w pełni zrozumieć mechanizmy leżące u podstaw zmian w metabolizmie leków obserwowanych u osób zakażonych HCV i z innymi chorobami wątroby, konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych badań, także łączących badania mRNA, proteomiczne i genetyczne z oceną aktywności enzymatycznej w tym samym materiale. Pozwoliłoby to na opracowanie w przyszłości bardziej skutecznych i bezpiecznych opcji terapeutycznych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów.

7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

1. Stężenia mRNA i białek dla większości enzymów metabolizujących leki u pacjentów z niewydolnością wątroby w przebiegu HCV były obniżone w porównaniu do wątroby pacjentów z grupy kontrolnej, zaobserwowano jednak różnice pomiędzy poszczególnymi badanymi enzymami. W szczególności:

- zawartość w tkance białka CYP1A2, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 była istotnie mniejsza,
- zawartość białka UGT2B7, i UGT2B15 oraz UGT1A3 nie była znacząco zmieniona,
- zawartość białka UGT1A1 była podwyższona, szczególnie u pacjentów w klasie A niewydolności wątroby wg skali Childa-Pugha.

2. Obserwowane zmiany stężenia białek enzymów metabolizujących leki były zależne od stopnia niewydolności narządu określanej na podstawie skali Childa-Pugha.

3. Stężenia badanych białek u pacjentów z HCV wykazywały korelację z ekspresją kodujących je genów mierzoną na poziomie mRNA, jednak korelacja ta nie była pełna i różniła się, w zależności od badanego enzymu.

4. Czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19, przy czym w przypadku pierwszych dwóch genów obserwowane różnice zależne od genotypu były istotne statystycznie.

5. Wyniki niniejszej pracy wskazują pośrednio, że zarówno zmiany spowodowane zaburzeniem funkcji wątroby w przebiegu infekcji HCV, jak i polimorfizm genetyczny mogą być przyczyną zmienionej aktywności enzymów metabolizujących leki, a w konsekwencji zmienionej farmakokinetyki wielu leków. Wiedza ta może być użyteczna w opracowaniu bardziej skutecznych i bezpiecznych strategii terapeutycznych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Farmakokinetyka leków jest w dużej mierze determinowana przez enzymy metabolizujące leki, na które mogą wpływać choroby wątroby. Aktywność tych enzymów jest kluczowym czynnikiem w metabolizmie leków.

Celem badań była: (1) ocena profilu ekspresji mRNA wybranych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem leków, (2) ilościowe określenie zawartości białek wybranych enzymów CYP450 i UGT, (3) określenie korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka, (4) analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków na poziomie mRNA i białka w bioptatach wątroby pobranych od pacjentów z niewydolnością tego organu w przebiegu HCV oraz w grupie kontrolnej.

Materialy i metody: W badaniu wykorzystano próby tkanek wątroby pobrane od pacjentów z HCV w różnych stanach funkcjonalnych, zgodnie z klasyfikacją Childa-Pugha, w tym klasy A (30 próbek), klasy B (21 próbek) i klasy C (7 próbek). Próby kontrolne stanowiły bioptaty wątroby pochodzące od pacjentów z rakiem okrężnicy z przerzutami do wątroby, pobrane z miejsca oddalonego o co najmniej 5 cm od guza, bez cech patologicznych (n=20). W pracy przeanalizowano zawartość białka (LC-MS/MS) i mRNA (qRT-PCR) 9 enzymów CYP450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) i czterech UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 i UGT2B15). Dodatkowo, w przypadku CYP2D6, CYP2C19 i CYP3A5, przeprowadzono badania genetyczne pod kątem występowania najbardziej rozpowszechnionych wariantów funkcjonalnych, wykorzystując sondy typu TaqMan.

Wyniki: W badaniu stwierdzono, że stężenia białka CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 i CYP2D6 nie był istotnie zmieniony przez chorobę. W wątrobach pacjentów zakwalifikowanych do klasy A wg Childa-Pugha stwierdzono istotnie zwiększoną zawartość białka UGT1A1 (średnio 163% wartości dla grupy kontrolnej). W wątrobach od pacjentów z klasy B Childa-Pugha zawartość niektórych białek była istotnie mniejsza: CYP2C19 (38% kontroli), CYP2E1 (54%), CYP3A4 (33%), UGT1A3 (69%) i UGT2B7 (56%). W wątrobach klasy C wg Child-Pugh stwierdzono mniejsze stężenie białka CYP1A2 (52% wartości w grupie kontrolnej). Średnia zawartość większości pozostałych

białek także była niższa w grupie HCV, jednak różnice nie osiągnęły progu istotności statystycznej. Stężenia badanych białek u pacjentów z HCV wykazywały korelację z ekspresją kodujących je genów mierzoną na poziomie mRNA, jednak korelacja ta nie była pełna i różniła się, w zależności od badanego enzymu. Wyniki wskazują, że zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C może znacząco wpływać na ekspresję genów i stężenie białek enzymów metabolizujących leki w wątrobie, a obserwowane różnice zależą w znacznym stopniu od stanu zaawansowania choroby. Czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19, przy czym w przypadku pierwszych dwóch genów obserwowane różnice zależne od genotypu były istotne statystycznie.

Podsumowanie: Badanie wykazało, że zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C może prowadzić do istotnych zmian w ekspresji genów i stężeniu białek biorących udział w metabolizmie leków w wątrobie, a zakres tych zmian jest związany ze stopniem zaawansowania choroby oraz genotypem pacjenta. Wyniki niniejszej pracy mogą dostarczyć ważnych danych na temat zmienionego metabolizmu leków w przebiegu HCV i mogą zostać w przyszłości wykorzystane do optymalizacji strategii terapeutycznych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów, zarówno w farmakoterapii HCV, jak i chorób współistniejących.

9. SUMMARY

Introduction: Drug pharmacokinetics is largely determined by drug-metabolising enzymes, which can be affected by liver disease. The activity of these enzymes is a key factor in drug metabolism.

The aim of this study was to (1) assess the mRNA expression profile of selected genes encoding enzymes associated with drug metabolism, (2) quantify the protein content of selected CYP450 and UGT enzymes, (3) determine the correlation between mRNA expression of the genes studied and protein content, (4) analyse the relationship between selected genetic variants and the expression of genes associated with drug metabolism at the mRNA and protein level in liver biopsy specimens taken from patients with failure of this organ in the course of HCV and in a control group.

Materials and methods: Liver tissue samples from HCV patients in different functional states, according to the Child-Pugh classification, including class A (30 samples), class B (21 samples) and class C (7 samples), were used in this study. Control samples were liver biopsy specimens from patients with colon cancer with liver metastases, taken from a site at least 5 cm away from the tumour, without pathological features (n=20). In this study, protein (LC-MS/MS) and mRNA (qRT-PCR) of nine CYP450 enzymes (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) and four UGTs (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 and UGT2B15) were analysed. In addition, for CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A5, genetic screening for the most prevalent functional variants was performed using TaqMan assay.

Results: The study found that protein levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 and CYP2D6 were not significantly altered by the disease. Livers from patients classified as Child-Pugh class A showed significantly increased UGT1A1 protein (on average 163% of the value for the control group). In livers from Child-Pugh class B patients, the content of some proteins was significantly lower: CYP2C19 (38% of controls), CYP2E1 (54%), CYP3A4 (33%), UGT1A3 (69%) and UGT2B7 (56%). Child-Pugh class C livers had lower CYP1A2 protein levels (52% of control values). The average content of most other proteins was also lower in the HCV group, but the differences did not reach the threshold of statistical significance. The

concentrations of the proteins studied in HCV patients showed a correlation with the expression of the genes encoding them measured at the mRNA level, but this correlation was not complete and varied, depending on the enzyme tested. The results indicate that hepatitis C virus infection can significantly affect gene expression and protein levels of drug-metabolising enzymes in the liver, and the observed differences are highly dependent on disease status. Genetic factors can affect the mRNA and protein levels of CYP2D6, CYP3A5 and CYP2C19 enzymes, and for the first two genes the observed genotype-dependent differences were statistically significant.

Summary: This study showed that hepatitis C virus infection can lead to significant changes in gene expression and protein levels involved in drug metabolism in the liver, and that the extent of these changes is related to the severity of the disease and the patient's genotype. The results of the present study may provide important data on altered drug metabolism in the course of HCV and may be used in the future to optimise therapeutic strategies tailored to individual patients, both in HCV pharmacotherapy and in comorbidities

10.PIŚMIENNICTWO

- [1] Furge LL., Guengerich FP. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochem Mol Biol Educ.* 34: 66-74. 2006.
- [2] Wiśniewska A., Mazerska Z. Izoenzymy cytochromu p450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych. *Post Bioch* 55: 259-271. 2009.
- [3] Kurzawski M., Dzieziejko V., Post M., Wójcicki M., Urańska E., Miętkiewski J., Drożdżik M. Expression of genes involved in xenobiotic metabolism and transport in end-stage liver disease: up-regulation of ABCC4 and CYP1B1. *Pharmacological Reports.*64: 972-939. 2012.
- [4] Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Frontiers in Pharmacology.* 18:1-10. 2012.
- [5] Wei L., Gong X., Martinez OM., Krams SM. Differential expression and functions of microRNAs in liver transplantation and potential use as non-invasive biomarkers. *Transpl Immunol.* 29: 123-129. 2013.
- [6] Abdel-Razzak Z., Loyer P., Fautrel A., Gautier J. C., Corcos L., Turlin B., Beaune P., Guillouzo A. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 44: 707–715. 1993.
- [7] Millman, A. J., Nelson, N. P., & Vellozzi, C. Hepatitis C: Review of the Epidemiology, Clinical Care, and Continued Challenges in the Direct Acting Antiviral Era. *Current epidemiology reports,* 4(2): 174–185. 2017.
- [8] Gajewski P. et al. *Interna Szczeklika. Medycyna Praktyczna.* 1183-1206. Kraków 2020. ISBN 978-83-7430-627-0.
- [9] Wong LL. Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr Opin Chem Biol.*2(2):263-8.1998.
- [10] Dostęp online: (grudzień 2021), [W:] <https://www.mp.pl/pacjent/gastrologia/choroby/watroba/50948,watroba-budowa-i-funkcje>.
- [11] Shargel L. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics.* McGraw-Hill Education. 2012. ISBN: 978-0-07-182964-9.
- [12] Zabel M. *Histologia. Podręcznik dla studentów medycyny i stomatologii.* Wydanie I. Urban & Partner. 221-227. Wrocław 2010. ISBN: 978-83-87944-61-2.
- [13] Molowa DT, Schuetz EG, Wrighton SA, et al. Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America. 83(14): 5311-5. 1986.

- [14] Bogacz A. Ocena wpływu wybranych roślin leczniczych na poziom transkrypcji genów CYP3A1 i CYP 2D2 w badaniach in vivo. Rozprawa doktorska. 15-35. Poznań. 2010.
- [15] Tomaszewki P., Kubiak-Tomaszewska G., Pachecka J. Cytochrome P450 polymorphism - molecular, metabolic and pharmacogenetic aspect. II. Participation of CYP isoenzymes in the metabolism of endogenous substances and drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 65: 307-318. 2008. ISSN 0001-6837.
- [16] Nelson D., Zeldin D., Hoffman S., Maltais L., Wain H., Nebert D. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*. 1-18. 2004.
- [17] Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab*. 9:129-43. 2008.
- [18] Guengerich F. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 21: 70-83. 2008.
- [19] Franz, C.C.; Hildbrand, C.; Born, C.; Egger, S.; Rätz, B.; Krähenbühl, S. Dose adjustment in patients with liver cirrhosis: Impact on adverse drug reactions and hospitalizations. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 69:1565–1573. 2013.
- [20] European Medicines Agency 2005. Guideline on the Evaluation of the Pharmacokinetics of Medicinal Products in Patients with Impaired Hepatic Function. February 2005. Dostęp online (luty 2022) [W]: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-evaluation-pharmacokinetics-medicinal-products-patients-impaired-hepatic-function_en.pdf
- [21] FDA. Guidance for Industry Pharmacokinetics in Patients with Impaired Hepatic Function: Study, Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling. 2003. Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.fda.gov/media/71311/download>
- [22] Meunier B, de Visser SP, Shaik. "Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes". *Chemical Reviews*. 104: 3947–3980. 2010.
- [23] Rittle J, Green MT. "Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics". *Science*. 330: 933–937. 2010
- [24] Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem*. 266: 13469-13472. 1991.

- [25] Wiliams J., Hyland R., Jones B. Drug-drug interactions for the UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure. *Drug Metabolism*. 32: 1201:1208. 2004.
- [26] Stryer L. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2003.
- [27] Isin E. i F. Guengerich. Complex reactions catalyzed by Cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3): 314-329. 2007.
- [28] Hames D. i N. Hooper. *Krótkie wykłady. Biochemia*. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN. 2012.
- [29] Botham K. i P. Mayes. *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 118-122, 342, 617, 763. Warszawa. 2018.
- [30] Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *The New England Journal of Medicine*, 348: 529-537. 2003.
- [31] Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, Coughtrie MW. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT "pie". *Drug Metab Dispos*. 37(11):2255-61. 2009.
- [32] Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 40:581-616. 2000.
- [33] Gurusamy U., Shewade D. *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. 2014.
- [34] Vuppalanchi R. *Metabolism of Drugs and Xenobiotics, Practical Hepatic Pathology*. 2011.
- [35] Zeruesenay D., Flockhart D. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism in Clinical and Translational Science (Second Edition)*. 2017.
- [36] William C. Schaffenburg, Cynthia M.C. DeKlotz, *Comprehensive Dermatologic Drug Therapy (Fourth Edition)*. 14-20. 2021.
- [37] Bradley L. Urquhart, Thomas D. Nolin. *Drug Metabolism in Chronic Kidney Disease. Chronic Renal Disease (Second Edition)*. 7: 475. 2020.
- [38] Cacabelos R., Torrellas C., *Personalized Medicine of Alzheimer's Disease. Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. 2014.
- [39] Ahmed A, Lutchman A, Kwo Y. Drug-drug interactions in hepatitis C virus treatment: Do they really matter? *Clin Liver Dis*. 2017.
- [40] Krekels E., Sherwin C. *Hepatic Drug Metabolism. Pediatric Patients, in Drug Metabolism in Diseases*. 2017.
- [41] Rommel G. Tirona, Richard B. Kim. *Introduction to Clinical Pharmacology. Clinical and Translational Science (Second Edition)*. 2017.

- [42] Shao Z., Ito S. Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics. Handbook of Analytical Separations. 2020.
- [43] Dasgupta A. Genetic Factors Associated With Opioid Therapy and Opioid Addiction. Fighting the Opioid Epidemic. 2020.
- [44] Mróz A., Mazerska Z. Glucuronidation of antitumour therapeutics – detoxification, mechanism of resistance or prodrug formation? *Postepy Hig Med Dosw.* 69: 1462-1477. 2015.
- [45] Walsh, A.A., Szklarz, G.D., Scott, E.E. Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *J Biol Chem* 288: 12932-12943. 2013.
- [46] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P04798>
- [47] Sansen, S., Yano, J.K., Reynald, R.L., Schoch, G.A., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *J Biol Chem* 282: 14348-14355. 2007.
- [48] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P05177>
- [49] Kaur, P., Chamberlin, R., Poulos, T.L., Sevrioukova, I.F. Structure-Based Inhibitor Design for Evaluation of a Cyp3A4 Pharmacophore Model. *J Med Chem* 59: 4210. 2016.
- [50] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08684>
- [51] Shah, M.B., Zhang, Q., Halpert, J.R. Crystal Structure of CYP2B6 in Complex with an Efavirenz Analog. *Int J Mol Sci.* 19. 2018.
- [52] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P20813>
- [53] Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D., Johnson, E.F. Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J Biol Chem* 279: 9497-9503. 2004.
- [54] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10632>
- [55] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P10635>
- [56] Brodney, M.A., Beck, E.M., Butler et al. Utilizing Structures of CYP2D6 and BACE1 Complexes To Reduce Risk of Drug-Drug Interactions with a Novel Series of Centrally Efficacious BACE1 Inhibitors. *J Med Chem* 58: 3223-3252. 2015.
- [57] Williams, P.A., Cosme, J., Ward, A., Angove, H.C., Matak Vinkovic, D., Jhoti, H. Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2C9 with Bound Warfarin. *Nature.* 424: 464. 2003.
- [58] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P11712>

- [59] Reynald, R.L., Sansen, S., Stout, C.D., Johnson, E.F. Structural Characterization of Human Cytochrome P450 2C19: ACTIVE SITE DIFFERENCES BETWEEN P450s 2C8, 2C9, AND 2C19. *J Biol Chem* 287: 44581-44591. 2012.
- [60] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P33261>
- [61] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P22309>
- [62] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P22309>
- [63] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35503>
- [64] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P16662>
- [65] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/P54855>
- [66] Dostęp online (luty 2022) [W]: <https://www.uniprot.org/uniprot/O75795>
- [67] Mróz A., Mazerska Z. Glucuronidation of antitumour therapeutics – detoxification, mechanism of resistance or prodrug formation? *Postepy Hig Med Dosw.* 69: 1462-1477. 2015.
- [68] Bauer B., Hartz A.M., Fricker G., Miller D.S.: Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol. Pharmacol.* 2004; 66: 413-419
- [69] Ott M., Fricker G., Bauer B.: Pregnane X receptor (PXR) regulates P-glycoprotein at the blood-brain barrier: functional similarities between pig and human PXR. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009;329: 141-149
- [70] Goodwin B., Moore L.B., Stoltz C.M., McKee D.D., Kliewer S.A.: Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 60: 427-431
- [71] Kurzawski M., Dziedziczko V., Post M., Wójcicki M., Urańska E., Miętkiewski J., Drożdżik M. Expression of genes involved in xenobiotic metabolism and transport in end-stage liver disease: up-regulation of ABCC4 and CYP1B1. *Pharmacological Reports* .64: 972-939. 2012.
- [72] Giacomini KM and Huang SM. *Clin Pharmacol Ther.* 94:3-9. 2013.
- [73] Geier A., Wagner M., Dietrich C., Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis inflammation and liver regeneration *Biochimica et Biophysica Acta.*1773.283-308. 2006 .
- [74] Moosavy, S. H., Davoodian, P., Nazarnezhad, M. A., Nejatizadeh, A., Eftekhari, E., & Mahboobi, H. . Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. *Electronic physician*, 9:5646–5656. 2017.
- [75] H. Li, S. Lo. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and treatment. *World journal of hepatology.* 8: 1377-1389. 2015.

- [76] Alberti A, Chemello L, Benvegnù L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol. Suppl* 1:17-24. 1999.
- [77] Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*.36:S21-S29. 2002.
- [78] Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci.* 3:47-52. 2006.
- [79] Carrozzo M, Scally K. Oral manifestations of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 20:7534-7543. 2014.
- [80] Ozkok A, Yildiz A. Hepatitis C virus associated glomerulopathies. *World J Gastroenterol.* 20:7544-7554. 2014.
- [82] Grimbert S, Valensi P, Lévy-Marchal C, Perret G, Richardet JP, Raffoux C, Trinchet JC, Beaugrand M. High prevalence of diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C. A case-control study. *Gastroenterol Clin Biol.* 20:544-548. 1996.
- [83] Modelowy program profilaktyki zakażeń HCV. EESTAHC. Kraków. 2016.
- [84] Bogucki M. Diagnostyka i terapia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C (wirusem HCV) w Polsce: raport rekomendacje. 2014.
- [85] Instytut Ochrony Zdrowia. Dostęp online (luty 2022) [W]: <http://ioz.warski.com.pl/downloadProjectFiles.php?rid=13>. 23 Zieliński A. Virusowe zapalenie wątroby typu B i C w Polsce w latach 1993 2011.
- [86] Dostęp online (grudzień 2021) [W]: http://www.pzh.gov.pl/page/fileadmin/user_upload/SPPW/Konferencja_inaugurujaca/prezentacje/Prezentacja%20%20HCV%20%20projekty.ppt
- [87] Dostęp online (grudzień 2021) [W]: http://www.pzh.gov.pl/page/fileadmin/user_upload/SPPW/Konferencja_inaugurujaca/prezentacje/Prezentacja%20%20HCV%20%20projekty.pptx.
- [88] E. Gower, C. Estes, S. Blach et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology.* 61: 545-557. 2014.
- [89] <https://gis.gov.pl/wp-content/uploads/2018/04/Epidemiologia-i-diagnostyka-HCV-prezentacja.pdf>
- [90] Bartenschlager R., Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81: 1631-1648. 2000
- [92] X. Yu, M. Qiao, I. Atanasov et al. Cryo-electron microscopy and three dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* 367: 126-134. 2007.
- [93] Lukavsky P. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* 2007.

- [94] Tan S. Hepatitis C viruses: genomes and molecular biology. Horizon Bioscience. 2006.
- [95] Lemon S., Walker C., Alter M. et al. Hepatitis C virus. Field virology. 1053-1304. 2007.
- [96] Chevaliez S. Pavlotsky J., Virology of hepatitis C virus infection. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 26: 381-389. 2012.
- [97] Penin F., Dubuisson J., Rey F. et al. Structural biology of hepatitis C virus. Hepatology. 39: 5-19. 2004.
- [98] E. Gower, C. Estes, S. Blach et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. Journal of Hepatology. 61: 545-557. 2014.
- [99] Choo L. Kuo G. Weiner A. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244: 359-362. 1989.
- [100] Gatselis K., Zachou K., Saitis A. et al. Individualization of chronic hepatitis C treatment according to the host characteristics. World J Gastroenterol. 20:2839-2853. 2014.
- [101] Zhu Y., Chen S., Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy. World J Gastroenterol. 19: 8963-8973. 2013.
- [102] Dostęp online (kwiecień 2022) [W]: <https://easl.eu/publications/clinical-practice-guidelines/>
- [103] Wosek P., Gozdowska J., Durlik M. Analiza zmian w schematach leczenia przewlekłego zapalenia wątroby na tle zakażenia HCV na przestrzeni lat. Forum Nefrologiczne. 9: 178-188. 2016.
- [104] Elbasvir/grazoprevir Aust Prescr 40:32–4. 2017.
- [105] Roth D., Nelson D., Bruchfeld A. Grazoprevir plus elbasvir in treatment-naive and treatment-experienced patients with hepatitis C virus genotype 1 infection and stage 4–5 chronic kidney disease (the C-SURFER study): a combination phase 3 study. Lancet. 386: 1537–45. 2015.
- [106] Keating G. Elbasvir/Grazoprevir: First Global Approval. Drugs. 76:617–624. 2016.
- [107] Crouchet E., Wrensch F., Schuster K. et al. Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. Ther Adv Gastroenterol. 2018.
- [108] Gogela N., Lin M., Wisocky J., Chung R. Enhancing our understanding of current therapies for hepatitis C virus. HIV/AIDS REPORTS. 12:68-78. 2015.
- [109] Vitale A., Spolverato G. Burra P. Liver transplantation NITp working group. Transplant. Int. 28:1055-1065. 2015.

- [110] Paul Y., Kwo P., Badshah M., New hepatitis C virus therapies: drug classes and metabolism. *Organ Transpl.* 20: 235-241. 2015
- [111] Ogawa E., Furusyo N., Kajiwara E. Comparative effectiveness and safety study of triple therapy with simeprevir or telaprevir for non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C virus with genotype 1b infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30: 1759-1767. 2015
- [112] Maan R. van der Meer A. Recent advances in managing chronic HCV infection: focus on therapy in patients with severe liver disease. *F1000Res.* 17:5. 2016
- [113] Geddawy A., Geddawy Y., Elbahie N. et al. Direct acting anti-hepatitis C virus drugs: Clinical pharmacology and future direction. *Journal of Translational Internal Medicine.* 2017.
- [114] Kitab B, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Host-Targeting Antivirals for Treatment of Hepatitis C. In: Rodrigo L, Martins I, Guo X, Qi X, editors. *Advances in Hepatology.* London: IntechOpen; 2021.
- [115] Zhu H, Wong-Staal F, Lee H, Syder A, McKelvy J, Schooley RT, Wyles DL. Evaluation of ITX 5061, a scavenger receptor B1 antagonist: resistance selection and activity in combination with other hepatitis C virus antivirals. *J Infect Dis.* 2012.
- [116] Sulkowski MS, Kang M, Matining R, Wyles D, Johnson VA, Morse GD, Amorosa V, Bhattacharya D, Coughlin K, Wong-Staal F, Glesby MJ; AIDS Clinical Trials Group A5277 Protocol Team. Safety and antiviral activity of the HCV entry inhibitor ITX5061 in treatment-naïve HCV-infected adults: a randomized, double-blind, phase 1b study. *J Infect Dis.* 2014.
- [117] Meuleman P, Hesselgesser J, Paulson M, Vanwolleghem T, Desombere I, Reiser H, Leroux-Roels G. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology.* 2008.
- [118] Fofana I, Krieger SE, Grunert F, Glaubien S, Xiao F, Fafi-Kremer S, Soulier E, Royer C, Thumann C, Mee CJ, McKeating JA, Dragic T, Pessaux P, Stoll-Keller F, Schuster C, Thompson J, Baumert TF. Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology.* 2010.
- [119] Maily L, Xiao F, Lupberger J, Wilson GK, Aubert P, Duong FHT, Calabrese D, Leboeuf C, Fofana I, Thumann C, Bandiera S, Lütgehetmann M, Volz T, Davis C, Harris HJ, Mee CJ, Girardi E, Chane-Woon-Ming B, Ericsson M, Fletcher N, Bartenschlager R, Pessaux P, Vercauteren K, Meuleman P, Villa P, Kaderali L, Pfeffer S, Heim MH, Neunlist M, Zeisel MB, Dandri M, McKeating JA, Robinet E, Baumert TF. Clearance of persistent hepatitis C virus infection in humanized mice using a claudin-1-targeting monoclonal antibody. *Nat Biotechnol.* 2015.

- [120] Colpitts CC, Tawar RG, Maily L, Thumann C, Heydmann L, Durand SC, Xiao F, Robinet E, Pessaux P, Zeisel MB, Baumert TF. Humanisation of a claudin-1-specific monoclonal antibody for clinical prevention and cure of HCV infection without escape. *Gut*. 2018.
- [121] Maily L, Wrensch F, Heydmann L, Fauvelle C, Brignon N, Zeisel MB, Pessaux P, Keck ZY, Schuster C, Fuerst TR, Fong SKH, Baumert TF. In vivo combination of human anti-envelope glycoprotein E2 and -Claudin-1 monoclonal antibodies for prevention of hepatitis C virus infection. *Antiviral Res*. 2019.
- [122] Shimizu Y, Yoneda K, Shirasago Y, Suzuki T, Tada M, Ishii-Watabe A, Sugiyama K, Suzuki T, Wakita T, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M. Human-rat chimeric anti-occludin monoclonal antibodies inhibit hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019.
- [123] Lupberger J, Zeisel MB, Xiao F, Thumann C, Fofana I, Zona L, Davis C, Mee CJ, Turek M, Gorke S, Royer C, Fischer B, Zahid MN, Lavillette D, Fresquet J, Cosset FL, Rothenberg SM, Pietschmann T, Patel AH, Pessaux P, Doffoël M, Raffelsberger W, Poch O, McKeating JA, Brino L, Baumert TF. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat Med*. 2011.
- [124] Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med*. 2012.
- [125] Monroy-Bravo H, Angulo J, Pino K, Labbé P, López-Lastra M, Soza A. Effect of ezetimibe in HCV viral load after liver transplantation. *Ann Hepatol*. 2016.
- [126] Inoue K, Umehara T, Ruegg UT, Yasui F, Watanabe T, Yasuda H, Dumont JM, Scalfaro P, Yoshida M, Kohara M. Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo. *Hepatology*. 2007.
- [127] Arai M, Tsukiyama-Kohara K, Takagi A, Tobita Y, Inoue K, Kohara M. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014.
- [128] Liu F, Shimakami T, Murai K, Shirasaki T, Funaki M, Honda M, Murakami S, Yi M, Tang H, Kaneko S. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. *Sci Rep*. 2016.
- [129] van der Ree MH, de Vree JM, Stelma F, Willemsse S, van der Valk M, Rietdijk S, Molenkamp R, Schinkel J, van Nuenen AC, Beuers U, Hadi S, Harbers M, van der Veer E, Liu K, Grundy J, Patick AK, Pavlicek A, Blem J, Huang M, Grint P, Neben S, Gibson NW, Kootstra NA, Reesink HW. Safety, tolerability, and antiviral effect of RG-101 in patients with chronic hepatitis C: a phase 1B, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2017.

- [130] Stelma F, van der Ree MH, Sinnige MJ, Brown A, Swadling L, de Vree JML, Willemse SB, van der Valk M, Grint P, Neben S, Klenerman P, Barnes E, Kootstra NA, Reesink HW. Immune phenotype and function of natural killer and T cells in chronic hepatitis C patients who received a single dose of anti-MicroRNA-122, RG-101. *Hepatology*. 2017.
- [131] Gane E, Stedman C, Dole K, Chen J, Meyers CD, Wiedmann B, Zhang J, Raman P, Colvin RA. A Diacylglycerol Transferase 1 Inhibitor Is a Potent Hepatitis C Antiviral in Vitro but Not in Patients in a Randomized Clinical Trial. *ACS Infect Dis*. 2017.
- [132] Insull W Jr, Koren M, Davignon J, Sprecher D, Schrott H, Keilson LM, Brown AS, Dujovne CA, Davidson MH, McLain R, Heinonen T. Efficacy and short-term safety of a new ACAT inhibitor, avasimibe, on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins, in patients with combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2001.
- [133] Hu L, Li J, Cai H, Yao W, Xiao J, Li YP, Qiu X, Xia H, Peng T. Avasimibe: A novel hepatitis C virus inhibitor that targets the assembly of infectious viral particles. *Antiviral Res*. 2017.
- [134] Neveu G, Barouch-Bentov R, Ziv-Av A, Gerber D, Jacob Y, Einav S. Identification and targeting of an interaction between a tyrosine motif within hepatitis C virus core protein and AP2M1 essential for viral assembly. *PLoS Pathog*. 2012.
- [135] Neveu G, Ziv-Av A, Barouch-Bentov R, Berkerman E, Mulholland J, Einav S. AP-2-associated protein kinase 1 and cyclin G-associated kinase regulate hepatitis C virus entry and are potential drug targets. *J Virol*. 89:4387-404. 2015.
- [136] Kovackova S, Chang L, Bekerman E, Neveu G, Barouch-Bentov R, Chaikuad A, Heroven C, Šála M, De Jonghe S, Knapp S, Einav S, Herdewijn P. Selective Inhibitors of Cyclin G Associated Kinase (GAK) as Anti-Hepatitis C Agents. *J Med Chem*. 58:3393-410. 2015.
- [137] R. Menon. A. Polepally. A. Khatri et al. Clinical pharmacokinetics of paritaprevir. *Clin Pharmacokinet*. 56: 1125-1137. 2017.
- [138] K. Agarwal, L. Castells, B. Mullhaupt et al. Sofosbuvir/velpatasfir for 12 weeks in genotype 1-4 HCV-infected liver transplant recipients. *Journal of Hepatology*. 69:603-607. 2018.
- [139] Hepatitis C guidance: AASLD-IDSAs recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology*. 62: 932-54. 2015.

- [140] Koff RS. The efficacy and safety of sofosbuvir, a novel, oral nucleotide NS5b polymerase inhibitor, in the treatment of chronic hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 39:478–87. 2014.
- [141] Keating GM, Vaidya A. Sofosbuvir: first global approval. *Drugs.* 74:273–82. 2014.
- [142] Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Kowdley KV, Nelson DR, De Jesus E, McHutchison JG, et al. Sofosbuvir (Gs-7977) plus peginterferon/ribavirin treatment-naïve patients with HCV genotype 1: a randomized, 28-day, dose-ranging trial. *J Hepatol.* 58:663–8. 2013.
- [143] J. Hochreiter, J. Lapham, F. Wong-Staal, et al. ITX 5061 quantification in human plasma with reverse liquid chromatography and mass spectrometry detection. *Antiviral therapy.* 18:329-336. 2013.
- [144] E. Crouchet, F. Wrensch, C. Schuster et al. Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Ther Adv Gastroenterol.* 11: 1-15. 2018.
- [145] Prasad, B.; Bhatt, D.K.; Johnson, K.; Chapa, R.; Chu, X.; Salphati, L.; Xiao, G.; Lee, C.; Hop, C.; Mathias, A.; et al. Abundance of phase 1 and 2 drug-metabolizing enzymes in alcoholic and hepatitis C cirrhotic livers: A quantitative targeted proteomics study. *Drug Metab. Dispos.* 46: 943–952. 2018.
- [146] Frye R. et al. Liver disease selectively modulates cytochrome P450 mediated metabolism. *Clin Pharmacol. Ther.* 2006.
- [147] Wenzel C., Drozdik M., Oswald S. Mass spectrometry-based targeted proteomics method for the quantification of clinically relevant drug metabolizing enzymes in human specimens. *Journal of Chromatography B* 1160. 2021.
- [148] Pratt V., Del Tredici A., Hachad H., Ji Y., Kalman L., Scott S., Weck K. Recommendations for Clinical CYP2C19 Genotyping Allele Selection. A Report of the Association for Molecular Pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 20: 269-276. 2018.
- [149] Estivill X, Armengol L. Copy Number Variants and Common Disorders: Filling the Gaps and Exploring Complexity in Genome-Wide Association Studies. *PLOS Genetics* 3(10): e190. 2007.
- [150] Buniello A. et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published GWAS, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Research.* 47. 2019.
- [151] Esposito I., Trinks J., Soriano V. Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 12, 1197–1209. 2016.
- [152] Drozdik M. Busch D. Lapczuk J., Müller J., Ostrowski M., Kurzawski M., Oswald S. Protein Abundance of Clinically Relevant Drug-Metabolizing

Enzymes in the Human Liver and Intestine: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* 104, 515–524. 2018.

- [153] Smolders E., de Kanter C., van Hoek B., Arends J., Drenth J., Burger D. Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Hepatitis C Virus Drugs in Patients with Liver and/or Renal Impairment. *Drug Saf.* 39, 589–611. 2016.
- [154] Smolders E., Jansen A., Ter Horst P., Rockstroh J., Back, D., Burger D. Viral Hepatitis C Therapy: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations: A 2019 Update. *Clin. Pharmacokinet.* 58, 1237–1263. 2019.
- [155] Drożdżik M., Łapczuk-Romanska J., Wenzel C., Szelaĝ-Pieniek S., Post M., Skalski Ł., Kurzawski M., Oswald S. Gene Expression and Protein Abundance of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Liver Pathology. *Pharmaceutics.* 13, 1334. 2021.
- [156] Drożdżik M., Łapczuk-Romanska J., Wenzel C., Skalski Ł., Szelaĝ-Pieniek S., Post M., Syczewska M., Kurzawski M., Oswald S. Protein Abundance of Drug Transporters in Human Hepatitis C Livers. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 79. 2022.
- [157] Pentikäinen P., Välisalmi L., Himberg J, Crevoisier C. Pharmacokinetics of midazolam following intravenous and oral administration in patients with chronic liver disease and in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 29, 272–277. 1989.
- [158] Congiu, M.; Mashford, M.L.; Slavin, J.L.K.; Desmond, P.V. UDP Glucuronosyltransferase mRNA Levels in Human Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* 30, 129–134. 2002.
- [159] Verbeeck, R.K. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64, 1147–1161. 2008.
- [160] Crotty, B.; Watson, K.J.; Desmond, P.V.; Mashford, M.L.; Wood, L.J.; Colman, J.; Dudley, F.J. Hepatic extraction of morphine is impaired in cirrhosis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36, 501–506. 1989
- [161] Marcellin, P.; de Bony, F.; Garret, C.; Altman, C.; Boige, V.; Castelnau, C.; Laurent-Puig, C.; Trinchet, J.C.; Rolan, P.; Chen, C.; et al. Influence of cirrhosis on lamotrigine pharmacokinetics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51, 410–414. 2001
- [162] Taburet, A.M.; Naveau, S.; Zorza, G.; Colin, J.N.; Delfraissy, J.F.; Chaput, J.C.; Singlas, E. Pharmacokinetics of zidovudine in patients with liver cirrhosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 47, 731–739. 1990.
- [163] Parker, G.; Bullingham, R.; Kamm, B.; Hale, M. Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 332–344. 1996.
- [164] Sonne, J.; Boesgaard, S.; Poulsen, H.E.; Loft, S.; Hansen, J.M.; Døssing, M.; Andreasen, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxazepam and

- metabolism of paracetamol in severe hypothyroidism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30, 737–742.1990.
- [165] Michaels, S.; Wang, M.Z. The revised human liver cytochrome P450 “Pie”: Absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics. *Drug Metab. Dispos.* 42, 1241–1251. 2014.
- [166] Hansen, J.; Palmfeldt, J.; Pedersen, K.W.; Funder, A.D.; Frost, L.; Hasselstrøm, J.B.; Jornil, J.R. Postmortem protein stability investigations of the human hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 using mass spectrometry. *J. Proteom.* 194, 125–131.2019.
- [167] Meyer, J.G.; Schilling, B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev. Proteom.* 14, 419–429. 2017.
- [168] Wegler, C.; Gaugaz, F.Z.; Andersson, T.B.; Wiśniewski, J.R.; Busch, D.; Gröer, C.; Oswald, S.; Norén, A.; Weiss, F.; Hammer, H.S.; et al. Variability in Mass Spectrometry-based Quantification of Clinically Relevant Drug Transporters and Drug Metabolizing Enzymes. *Mol. Pharm.* 14, 3142–3151. 2017.
- [169] Vasilogianni, A.M.; Al-Majdoub, Z.M.; Achour, B.; Peters, S.A.; Rostami-Hodjegan, A.; Barber, J. Proteomics of colorectal cancer liver metastasis: A quantitative focus on drug elimination and pharmacodynamics effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 88, 1811–1823. 2022.
- [170] Olafuyi, O.; Parekh, N.; Wright, J.; Koenig, J. Inter-ethnic differences in pharmacokinetics-is there more that unites than divides? *Pharmacol. Res. Perspect.* 9. 2021.
- [171] Mohamed, M.E.; Schladt, D.P.; Guan, W.; Wu, B.; van Setten, J.; Keating, B.J.; Iklé, D.; Remmel, R.P.; Dorr, C.R.; Mannon, R.B. et al. Tacrolimus troughs and genetic determinants of metabolism in kidney transplant recipients: A comparison of four ancestry groups. *Am. J. Transplant.* 19, 2795–2804. 2019.
- [172] Hsia, C.Y.; Huo, T.I.; Chiang, S.Y.; Lu, M.F.; Sun, C.L.; Wu, J.C.; Lee, P.C.; Chi, C.W.; Lui, W.Y.; Lee, S.D. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* 33, 208–212. 2007.
- [173] Bertoletti, A.; D’Elios, M.M.; Boni, C.; De Carli, M.; Zignego, A.L.; Durazzo, M.; Missale, G.; Penna, A.; Fiaccadori, F.; Del Prete, G.; et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology.* 112, 193–199. 1997.
- [174] Sakurai, T.; He, G.; Matsuzawa, A.; Yu, G.Y.; Maeda, S.; Hardiman, G.; Karin, M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 14, 156–165.2008.

- [175] Shrivastava, S.; Mukherjee, A.; Ray, R.; Ray, R.B. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J. Virol.* 87, 1228.2013.
- [176] Dickmann, L.J.; Patel, S.K.; Wienkers, L.C.; Slatter, J.G. Effects of interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-1 β /interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Curr. Drug Metab.* 13, 930–937.2012
- [177] Rubin, K.; Janefeldt, A.; Andersson, L.; Berke, Z.; Grime, K.; Andersson, T.B. HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug Metab. Dispos.* 43, 119–125.2015.
- [178] Ke, S.; Rabson, A.B.; Germino, J.F.; Gallo, M.A.; Tian, Y. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 276, 39638–39644.2001.
- [179] Donato, M.T.; Guillén, M.I.; Jover, R.; Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J. Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon- γ in human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 484–490.1997.
- [180] Beigneux, A.P.; Moser, A.H.; Shigenaga, J.K.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 145–149.2002.
- [181] Wang, X.; Rao, J.; Tan, Z.; Xun, T.; Zhao, J.; Yang, X. Inflammatory signaling on cytochrome P450-mediated drug metabolism in hepatocytes. *Front. Pharmacol.* 13 .2022.
- [182] Yang, J.; Hao, C.; Yang, D.; Shi, D.; Song, X.; Luan, X.; Hu, G.; Yan, B. Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 197, 219–226.2010.
- [183] Tirona, R.G.; Lee, W.; Leake, B.F.; Lan, L.B.; Cline, C.B.; Lamba, V.; Parviz, F.; Duncan, S.A.; Inoue, Y.; Gonzalez, F.J. et al. The orphan nuclear receptor HNF4 α determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat. Med.* 9, 220–224.2003.
- [184] Wang, Y.M.; Ong, S.S.; Chai, S.C.; Chen, T. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 8, 803–817.2012.
- [185] Kosloski, M.P.; Wang, H.; Pugatch, D.; Mensa, F.J.; Gane, E.; Lawitz, E.; Marbury, T.C.; Preston, R.A.; Kort, J.; Liu, W. Pharmacokinetics and safety of glecaprevir and pibrentasvir in HCV-negative subjects with hepatic impairment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 75, 217–226.2019.
- [186] Mogalian, E.; Mathias, A.; Brainard, D.; McNally, J.; Moorehead, L.; Hernandez, M.; Robson, R.A.; Ries, D.K.; Lasseter, K.; Marbury, T. The

pharmacokinetics of GS-5816, a pangenotype HCV NS5A inhibitor, in HCV-uninfected subject with moderate and severe hepatic impairment [abstract no. P742]. *J. Hepatol.* 60 (Suppl. 1), S317.2014.

- [187] Khatri, A.; Menon, R.; Marbury, T.C.; Lawitz, E.; Podsadecki, T.J.; Mullally, V.; Ding, B.; Awni, W.M.; Bernstein, B.M.; Dutta, S. Pharmacokinetics and safety of coadministered paritaprevir plus ritonavir (paritaprevir/r), ombitasvir, and dasabuvir in hepatic impairment. *J. Hepatol.* 63, 805–812.2015.
- [188] Sekar, V.; Simion, A.; Peeters, M.; Spittaels, K.; Lawitz, E.; Marbury, T.C.; De Smedt, G. Pharmacokinetics of TMC435 in subjects with moderate hepatic impairment [abstract no. 472]. *J. Hepatol.* 54 (Suppl. 1), S193.2011.
- [189] Ouwerkerk-Mahadevan, S.; Simion, A.; Spittaels, K.; Beumont-Mauviel, M. Pharmacokinetics of simeprevir (TMC435) in volunteers with moderate or severe hepatic impairment [abstract no. 887]. *J. Hepatol.* 58 (Suppl. 1), S229.2013.
- [190] EMA. Olysio Product Information. 2014. Dostęp online (luty 2022) [W]: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002777/WC500167867.pdf
- [191] Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics.* 22: 555–8. 2012.
- [192] Huszno J., Nowara E., Suwiński R. Znaczenie polimorfizmów genowych w chemioterapii nowotworów. *Journal of Oncology.* 61. 141-149. 2011.
- [193] Laskowska E., Kubica A., Kubica J. Genetyczne aspekty farmakokinetyki i farmakodynamiki kłopidogrelu. *Folia Cardiologica.* 10. 275–282. 2015.
- [194] Wojtczak A., Skrętowicz J. Rola polimorfizmu cytochromu P450 w metabolizmie leków stosowanych w farmakoterapii chorób układu krążenia. *Cardiol Pol.* 67. 1011-1014. 2009

11.SPIS RYCIN

Rysunek 1. Unaczynienie wątroby. Str. 11.

Rysunek 2. Gładkie retikulum endoplazmatyczne, w obrębie którego znajduje się układ mikrosomalny, bogaty w enzymy cytochromu P450. Str. 14.

Rysunek 3. Ogólny schemat biotransformacji leków. Str. 15.

Rysunek 4. Udział poszczególnych elementów układu detoksykacyjnego w procesach metabolicznych leków. Str. 16.

Rysunek 5. Etapy ekspresji genów CYP450. Str. 17.

Rysunek 6. Zmienność genetyczna DNA. Str. 19.

Rysunek 7. Struktura krystaliczna CYP1A1. Str. 20.

Rysunek 8. Struktura krystaliczna CYP1A2. Str. 20.

Rysunek 9. Struktura krystaliczna CYP3A4. Str. 21.

Rysunek 10. Struktura krystaliczna CYP2B6. Str. 21.

Rysunek 11. Struktura krystaliczna CYP2E1. Str. 22.

Rysunek 12. Struktura krystaliczna CYP2C8. Str. 22.

Rysunek 13. Struktura krystaliczna CYP2D6. Str. 23.

Rysunek 14. Struktura krystaliczna CYP2C9. Str. 23.

Rysunek 15. Struktura krystaliczna CYP2C9. Str. 24.

Rysunek 16. Struktura krystaliczna UGT1A1. Str. 24.

Rysunek 17. Struktura krystaliczna UGT1A3. Str. 25.

Rysunek 18. Struktura krystaliczna UGT2B7. Str. 25.

Rysunek 19. Struktura krystaliczna UGT2B15. Str. 26.

Rysunek 20. Struktura krystaliczna UGT2B17. Str. 27.

Rysunek 21. Wpływ liganda (karbamazepiny) na ekspresję genów kodujących enzymy metabolizujące leki (CYP3A4) z udziałem PXR, RXR, CAR. Str. 28.

Rysunek 22. Budowa wirionu HCV. Str. 29.

Rysunek 23. Przebieg naturalny HCV. Str. 31.

Rysunek 24. Źródła zakażeń HCV w Polsce w 2010 r. Str. 31.

Rysunek 25. Przypadki zachorowań na HCV i HIV w Polsce w latach 2005-2012. Str. 33.

Rysunek 26. Budowa genomu i wirusa HCV. Str. 34.

Rysunek 27. Proces cięcia poliproteiny wirusa HCV z rozróżnieniem udziału czynników komórkowych (gospodarza) i wirusowych (HCV). Str. 35.

Rysunek 28. Cykl replikacyjny wirusa HCV. Str. 36.

Rysunek 29. Receptory hepatocytarne, biorące udział we wnikaniu cząstek wirusa HCV do komórki wątroby. Str. 37.

Rysunek 30. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesie przyłączenia, wejścia i fuzji HCV do komórki hepatocyty. Str. 42.

Rysunek 31. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach replikacyjnych.. Str. 42.

Rysunek 32. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach translacyjnych. Str. 43.

Rysunek 33. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach obróbki potranskrypcyjnej. Str. 43.

Rysunek 34. Komponenty wirusowe i komórkowe biorące udział w procesach składania i uwalniania wirionu. Str. 44.

Rysunek 35. Punkty uchwytu DAA. Str. 49.

Rysunek 36. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w grupie kontrolnej. Str. 66.

Rysunek 37. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV. Str. 66.

Rysunek 38. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy A wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Str. 67.

Rysunek 39. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy B wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Str.67.

Rysunek 40. Zawartość białka wybranych enzymów metabolizujących leki w tkance wątrobowej w przebiegu HCV u pacjentów klasy C wg. oceny stopnia niewydolności wątroby w skali Childa-Pugha. Str. 68.

Rysunek 41 . Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP1A1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20).Str. 69.

Rysunek 42. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP1A2 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 70.

Rysunek 43. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2B6 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 71.

Rysunek 44. Poziom ekspresji (Rys. A.) i stężenie białka (Rys.B.) CYP2C8 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 72.

Rysunek 45. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2C9 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 73.

Rysunek 46. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2C19 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 74.

Rysunek 47. Poziom ekspresji (Rys. A.) i stężenie białka (Rys.B.) CYP2D6 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 75.

Rysunek 48. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP2E1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 76.

Rysunek 49. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP3A4 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 77.

Rysunek 50. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) CYP3A5 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 78.

Rysunek 51. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT1A1 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 79.

Rysunek 52. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT1A3 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 80.

Rysunek 53. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT2B7 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 81.

Rysunek 54. Względna ekspresja RNA (A) i stężenie białka (B) UGT2B15 w tkance wątrobowej, w przebiegu wirusowego zapalenia wątroby typu C: HCV (n=58), z uwzględnieniem podziału według skali Child-Pugh'a: A (n=30), B (n=21), C (n=7) w porównaniu do tkanki wątrobowej stanowiącej próbę kontrolną CTRL (n=20). Str. 82.

Rysunek 55. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP1A1*. Str. 83.

Rysunek 56. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP1A2*. Str. 84.

Rysunek 57. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2B6*. Str. 85.

Rysunek 58. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C8*. Str. 86.

Rysunek 59. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C9*. Str. 87.

Rysunek 60. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2C19*. Str. 88.

Rysunek 61. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2D6*. Str. 89.

Rysunek 62. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP2E1*. Str. 90.

Rysunek 63. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP3A4*. Str. 91.

Rysunek 64. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *CYP3A5*. Str. 92.

Rysunek 65. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT1A1*. Str. 93.

Rysunek 66. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT1A3*. Str. 94.

Rysunek 67. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT2B7*. Str. 95.

Rysunek 68. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją mRNA, a poziomem ekspresji białka dla genu *UGT2B15*. Str. 96.

Rysunek 69. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu (genetycznie uwarunkowana aktywność enzymu) dla genu *CYP2D6*. Str. 97.

Rysunek 70. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu dla genu *CYP2C19*. Str. 99.

Rysunek 71. Różnice w ekspresji mRNA (A) oraz zawartości białka (B) w zależności od genotypu dla genu *CYP3A5*. Str. 100.

12.SPIS TABEL

Tabela 1. Najważniejsze enzymy biorące udział w metabolizmie leków. Str. 20.

Tabela 2. Najczęściej wykorzystywane klasy leków w leczeniu HCV, ich dawki oraz najczęstsze działania niepożądane. Str. 39.

Tabela 3. Nowe leki stosowane w leczeniu HCV, z uwzględnieniem miejsca docelowego działania oraz przebiegu metabolizmu. Str. 47.

Tabela 4. Przedstawiciele kandydatów na leki z grupy HTA. Str. 50.

Tabela 5. Charakterystyka próby badanej i kontrolnej. Str. 52.

Tabela 6. Lista zestawów startery + sonda TaqMan użytych w badaniu. Podano Assay ID - identyfikator zestawu podany przez producenta. Str. 57.

Tabela 7. Lista sond TaqMan użytych w badaniu. Str. 62.

13. ZAŁĄCZNIKI

Spis załączników:

- 1.) **Tabela 8.** Różnice między analizowanymi grupami dotyczące poziomu ekspresji mRNA oraz stężenia białka (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP 3A4, CYP3A5 oraz UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, UGT2B15) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych.
- 2.) **Tabela 9.** Ekspresja mRNA najważniejszych genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie leków (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP 3A4*, *CYP3A5* oraz *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT2B7*, *UGT2B15*) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych
- 3.) **Tabela 10.** Stężenie białka (fmol/mg) najważniejszych enzymów biorących udział w metabolizmie leków (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP 3A4, CYP3A5 oraz UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, UGT2B15) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych
- 4.) **Artykuł:** Marek Drożdżik, Joanna Łapczuk-Romańska, Christoph Wenzel, Łukasz Skalski, Sylwia Szelań-Pieniek, Mariola Post, Arkadiusz Parus, Marta Syczewska, Mateusz Kurzawski, Stefan Oswald. Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4543. 2023.

Tabela 8. Różnice między analizowanymi grupami dotyczące poziomu ekspresji mRNA oraz stężenia białka (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP 3A4, CYP3A5 oraz UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, UGT2B15) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych. Do analizy statystycznej zastosowano test Kruskala-Willisa oraz test Dunn. W tabeli podano wartości p.

	Ch-P A	Ch-P B	Ch-P C	Porównanie wszystkich grup
CYP1A1 - RNA				
Ch-P B	0.53			
Ch-P C	0.36	0.83		
HCV (A+B+C)	0.44	1.00	1.00	
Kontrola	0.65	1.00	0.91	0.91
CYP1A1 - BIAŁKO				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	0.33	1.00		
HCV (A+B+C)	0.39	1.00	1.00	
Kontrola	1.00	1.00	0.67	0.98
CYP1A2 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	0.43	1.00		
HCV (A+B+C)	0.008	0.0027	0.001	
Kontrola	1.00	1.00	0.76	0.0002
CYP1A2 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.97			
Ch-P C	0.07	0.64		
HCV (A+B+C)	1.00	0.10	0.008	
Kontrola	1.00	1.00	0.26	0.09
CYP2B6- RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	0.84		
HCV (A+B+C)	1.00	1.00	0.64	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00
CYP2B6 - BIAŁKO				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		

HCV (A+B+C)	1.00	1.00	1.00	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00
CYP2C8 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	0.02	0.009	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.0006
CYP2C8 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.73			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	0.56	1.00	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00
CYP2C19 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.0000	0.001	0.53	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.0000
CYP2C19 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.70			
Ch-P C	0.86	1.00		
HCV (A+B+C)	0.57	0.26	0.09	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.04
CYP2C9 - RNA				
Ch-P B	0.45			
Ch-P C	0.0094	0.29		
HCV (A+B+C)	0.0017	0.37	1.00	
Kontrola	0.70	1.00	0.07	0.03
CYP2C9- BIAŁKO				
Ch-P B	0.84			
Ch-P C	0.19	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	1.00	0.23	
Kontrola	1.00	1.00	0.59	1.00
CYP2D6- RNA				

Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.08	0.14	0.31	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.03
CYP2D6 - BIAŁKO				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	0.86	0.95		
HCV (A+B+C)	1.00	1.00	0.33	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00
CYP2E1 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.0000	0.0001	0.0003	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.0000
CYP2E1 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.01			
Ch-P C	0.50	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	0.01	0.40	
Kontrola	0.45	0.41	1.00	0.37
CYP3A4 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.06	0.14	0.72	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.01
CYP3A4 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.12			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.57	0.002	0.20	
Kontrola	1.00	0.8	1.00	0.02
CYP3A5 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	0.74	1.00		
HCV (A+B+C)	0.21	0.11	0.03	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.03
CYP3A5 - BIAŁKO				

Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.36	0.31	0.29	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.1
UGT1A1- RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	1.00	1.00	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	1.00
UGT1A1 - BIAŁKO				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.0057	0.07	0.53	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.005
UGT1A3 - RNA				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	0.0000	0.0017	0.002	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.0000
UGT1A3 - BIAŁKO				
Ch-P B	1.00			
Ch-P C	1.00	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	0.43	0.46	
Kontrola	1.00	1.00	1.00	0.34
UGT2B15 - RNA				
Ch-P B	0.42			
Ch-P C	0.03	0.71		
HCV (A+B+C)	0.003	0.59	1.00	
Kontrola	0.81	1.00	0.20	0.05
UGT2B15 - BIAŁKO				
Ch-P B	0.50			
Ch-P C	0.16	1.00		
HCV (A+B+C)	1.00	0.81	0.03	
Kontrola	1.00	1.00	0.62	0.15
UGT2B7 - RNA				

Ch-P B	1.00			
Ch-P C	0.14	0.78		
HCV (A+B+C)	0.0017	0.0001	0.0000	
Kontrola	1.00	1.00	0.40	0.0000
UGT2B7- BIAŁKO				
Ch-P B	0.04			
Ch-P C	0.0002	0.11		
HCV (A+B+C)	1.00	0.009	0.0000	
Kontrola	0.17	1.00	0.0083	0.03

Tabela 9. Ekspresja mRNA najważniejszych genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizmie leków (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP 3A4*, *CYP3A5* oraz *UGT1A1*, *UGT1A3*, *UGT2B7*, *UGT2B15*) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych.

RNA	mediana	min	max	średnia	SD	CV %
CYP1A1						
Ch-P A	0.964	0.158	4.110	1.240	1.011	82
Ch-P B	0.823	0.048	4.579	1.357	1.454	107
Ch-P C	0.265	0.106	1.696	0.687	0.698	102
HCV (A+B+C)	0.878	0.048	4.579	1.215	1.164	96
Kontrola	0.385	0.150	4.937	1.000	1.245	117
CYP1A2						
Ch-P A	0.364	0.015	1.271	0.491	0.357	73
Ch-P B	0.300	0.037	1.684	0.444	0.446	100
Ch-P C	0.143	0.004	1.282	0.302	0.462	153
HCV (A+B+C)	0.310	0.004	1.684	0.451	0.401	89
Kontrola	0.846	0.179	3.001	1.000	0.680	68
CYP2B6						
Ch-P A	0.925	0.131	4.242	1.161	0.931	80
Ch-P B	0.914	0.296	2.057	1.029	0.468	45
Ch-P C	0.442	0.150	4.361	1.107	1.488	134
HCV (A+B+C)	0.911	0.131	4.361	1.107	0.869	79
Kontrola	0.952	0.075	2.895	1.000	0.647	65
CYP2C8						
Ch-P A	0.616	0.285	1.263	0.657	0.268	41
Ch-P B	0.583	0.281	1.401	0.680	0.334	49
Ch-P C	0.371	0.082	1.240	0.542	0.399	74

HCV (A+B+C)	0.586	0.082	1.401	0.651	0.307	47
Kontrola	1.013	0.280	2.242	1.000	0.454	45
CYP2C9						
Ch-P A	1.562	0.577	3.710	1.747	0.669	38
Ch-P B	1.355	0.658	2.969	1.408	0.508	36
Ch-P C	1.083	0.122	1.529	0.906	0.568	63
HCV (A+B+C)	1.431	0.122	3.710	1.523	0.656	43
Kontrola	1.021	0.275	1.491	1.000	0.313	31
CYP2C19						
Ch-P A	0.273	0.103	0.600	0.278	0.122	44
Ch-P B	0.247	0.110	0.698	0.303	0.147	49
Ch-P C	0.311	0.213	1.259	0.528	0.430	81
HCV (A+B+C)	0.266	0.103	1.259	0.314	0.194	62
Kontrola	0.757	0.153	2.361	1.000	0.775	78
CYP2D6						
Ch-P A	0.621	0.028	1.694	0.735	0.393	53
Ch-P B	0.564	0.180	3.196	0.922	0.875	95
Ch-P C	0.588	0.290	1.281	0.691	0.333	48
HCV (A+B+C)	0.620	0.028	3.196	0.794	0.597	75
Kontrola	0.898	0.294	1.983	1.000	0.485	49
CYP2E1						
Ch-P A	0.568	0.061	1.046	0.545	0.255	47
Ch-P B	0.508	0.088	0.852	0.501	0.230	46
Ch-P C	0.454	0.092	0.664	0.395	0.242	61
HCV (A+B+C)	0.523	0.061	1.046	0.511	0.245	48
Kontrola	1.013	0.328	1.556	1.000	0.369	37
CYP3A4						
Ch-P A	0.490	0.075	1.498	0.594	0.411	69
Ch-P B	0.390	0.049	1.780	0.528	0.493	93
Ch-P C	0.951	0.002	2.559	0.900	0.934	104
HCV (A+B+C)	0.430	0.002	2.559	0.607	0.526	87
Kontrola	0.870	0.068	2.454	1.000	0.701	70
CYP3A5						
Ch-P A	0.993	0.181	1.900	1.018	0.492	48
Ch-P B	0.891	0.373	3.040	1.018	0.623	61
Ch-P C	1.085	0.304	4.397	1.352	1.398	103
HCV (A+B+C)	0.993	0.181	4.397	1.058	0.690	65
Kontrola	0.860	0.274	2.668	1.000	0.591	59
UGT1A1						
Ch-P A	0.263	0.038	1.055	0.367	0.251	68

Ch-P B	0.431	0.168	1.051	0.441	0.242	55
Ch-P C	0.241	0.125	0.890	0.362	0.282	78
HCV (A+B+C)	0.327	0.038	1.055	0.393	0.250	63
Kontrola	0.808	0.298	2.474	1.000	0.602	60
UGT1A3						
Ch-P A	0.521	0.226	1.132	0.609	0.248	41
Ch-P B	0.526	0.047	1.020	0.498	0.273	55
Ch-P C	0.235	0.028	1.301	0.367	0.429	117
HCV (A+B+C)	0.501	0.028	1.301	0.539	0.289	54
Kontrola	0.925	0.398	1.943	1.000	0.409	41
UGT2B7						
Ch-P A	1.677	0.427	4.326	1.858	0.852	46
Ch-P B	1.114	0.577	5.389	1.688	1.275	76
Ch-P C	1.046	0.044	1.693	0.961	0.593	62
HCV (A+B+C)	1.326	0.044	5.389	1.688	1.028	61
Kontrola	0.884	0.330	2.813	1.000	0.549	55
UGT2B15						
Ch-P A	0.964	0.158	4.110	1.240	1.011	82
Ch-P B	0.823	0.048	4.579	1.357	1.454	107
Ch-P C	0.265	0.106	1.696	0.687	0.698	102
Ch-P C	0.878	0.048	4.579	1.215	1.164	96
HCV (A+B+C)	0.385	0.150	4.937	1.000	1.245	117
Kontrola						

Tabela 10. Stężenie białka (fmol/mg) najważniejszych enzymów biorących udział w metabolizmie leków (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP 3A4, CYP3A5 oraz UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, UGT2B15) w próbach wątroby pochodzących od pacjentów z HCV z rozróżnieniem stopnia zaawansowania niewydolności wątroby (skala Child–Pugh A, B i C) oraz w próbach kontrolnych.

Białko [fmol/mg]	mediana	min	max	średnia	SD	CV %	Ilość prób z funkcjonalnym białkiem
CYP1A1							
Ch-P A	38.92	0.00	172.72	50.99	44.72	88	27/30
Ch-P B	34.08	0.00	96.52	34.13	24.51	72	18/21
Ch-P C	11.59	0.00	95.98	25.77	34.02	132	5/7
HCV (A+B+C)	34.10	0.00	172.72	41.84	38.05	91	50/58

Kontrola	21.50	0.00	190.27	37.68	50.75	135	18/20
CYP1A2							
Ch-P A	417.56	54.81	2579.01	687.47	653.63	95	30/30
Ch-P B	235.94	8.80	2000.00	530.71	584.24	110	21/21
Ch-P C	58.84	5.70	3019.78	495.06	1115.22	225	7/7
HCV (A+B+C)	315.49	5.70	3019.78	607.49	689.31	113	58/58
Kontrola	768.55	40.58	2645.59	953.10	738.45	77	20/20
CYP2B6							
Ch-P A	98.80	14.42	714.38	122.38	123.73	101	30/30
Ch-P B	108.82	11.31	327.99	106.15	66.84	63	21/21
Ch-P C	91.81	0.00	253.54	136.23	110.86	81	6/7
HCV (A+B+C)	102.89	0.00	714.38	118.18	103.69	88	57/58
Kontrola	91.57	14.28	292.68	103.05	70.91	69	20/20
CYP2C8							
Ch-P A	441.15	79.33	1822.19	556.65	402.90	72	30/30
Ch-P B	324.49	27.64	1282.94	383.07	265.64	69	21/21
Ch-P C	438.45	17.58	1061.03	414.16	362.21	87	7/7
HCV (A+B+C)	431.21	17.58	1822.19	476.61	358.10	75	58/58
Kontrola	532.83	101.21	1136.74	538.74	309.09	57	20/20
CYP2C9							
Ch-P A	2127.44	117.79	5517.80	2271.05	1302.05	57	30/30
Ch-P B	1849.97	55.28	5358.50	1792.89	1234.03	69	21/21
Ch-P C	1189.99	56.05	3599.48	1287.94	1200.44	93	7/7
HCV (A+B+C)	1919.72	55.28	5517.80	1979.27	1290.29	65	58/58
Kontrola	2007.57	630.81	5676.82	2290.74	1276.02	56	20/20
CYP2C19							
Ch-P A	97.07	0.00	331.75	82.46	74.53	90	22/30
Ch-P B	43.22	0.00	241.19	58.29	68.10	117	13/21
Ch-P C	44.73	0.00	93.11	41.75	34.88	84	5/7
HCV (A+B+C)	64.25	0.00	331.75	68.80	69.36	101	40/58
Kontrola	125.85	0.00	484.49	151.64	130.76	86	17/20
CYP2D6							
Ch-P A	267.43	43.44	620.00	287.80	152.77	53	29/29
Ch-P B	287.90	33.09	987.34	325.36	251.75	77	19/19
Ch-P C	164.24	37.53	507.12	204.60	160.91	79	7/7
HCV (A+B+C)	258.87	33.09	987.34	290.19	193.63	67	55/55
Kontrola	292.45	55.71	852.82	364.67	239.57	66	19/19
CYP2E1							
Ch-P A	1309.31	102.88	4681.23	1556.95	1061.46	68	30/30
Ch-P B	587.85	36.86	2387.59	841.79	593.38	70	21/21
Ch-P C	513.47	122.55	3413.52	1190.05	1329.37	112	7/7
HCV	1055.84	36.86	4681.23	1253.73	997.10	80	58/58

(A+B+C)							
Kontrola	1394.06	272.07	3407.44	1549.54	814.53	53	20/20
CYP3A4							
Ch-P A	456.10	37.50	1937.67	588.81	452.50	77	30/30
Ch-P B	193.56	7.54	1126.37	323.88	315.60	97	21/21
Ch-P C	89.72	0.00	1421.24	612.49	705.33	115	6/7
HCV (A+B+C)	336.19	0.00	1937.67	495.75	456.73	92	57/58
Kontrola	672.99	99.21	2634.15	967.18	745.25	77	20/20
CYP3A5							
Ch-P A	34.89	14.98	388.78	69.85	93.83	134	30/30
Ch-P B	38.74	0.00	228.86	53.44	57.41	107	59.41885
Ch-P C	30.91	15.68	83.09	39.16	26.22	67	7/7
HCV (A+B+C)	34.89	0.00	388.78	60.20	76.34	127	57/58
Kontrola	50.66	20.96	679.89	108.82	157.78	145	20/20
UGT1A1							
Ch-P A	1088.71	351.92	2666.97	1193.62	617.95	52	30/30
Ch-P B	1096.75	95.74	2283.39	1045.42	542.46	52	21/21
Ch-P C	771.96	496.80	2705.02	1157.68	824.09	71	7/7
HCV (A+B+C)	1037.17	95.74	2705.02	1135.62	611.43	54	58/58
Kontrola	619.52	182.88	1123.72	641.33	309.24	48	20/20
UGT1A3							
Ch-P A	173.09	22.14	723.94	201.59	164.01	81	30/30
Ch-P B	123.01	30.98	449.01	163.90	109.10	67	21/21
Ch-P C	132.28	73.17	329.48	144.44	88.98	62	7/7
HCV (A+B+C)	152.54	22.14	723.94	181.04	138.53	77	58/58
Kontrola	205.20	80.90	657.50	235.37	151.87	65	20/20
UGT2B7							
Ch-P A	1569.70	318.02	4663.00	1739.64	1002.68	58	30/30
Ch-P B	1003.76	0.00	3642.30	1059.29	746.98	71	20/21
Ch-P C	397.70	0.00	734.09	390.52	240.72	62	6/7
HCV (A+B+C)	1039.07	0.00	4663.00	1330.48	968.04	73	56/58
Kontrola	1700.99	344.22	3455.79	1904.59	913.12	48	20/20
UGT2B15							
Ch-P A	563.55	127.38	1314.02	540.11	288.00	53	30/30
Ch-P B	360.11	139.75	1637.92	427.85	326.19	76	21/21
Ch-P C	218.37	101.54	2245.26	516.23	767.31	149	7/7
HCV (A+B+C)	392.91	101.54	2245.26	496.58	379.86	76	58/58
Kontrola	550.30	174.36	1670.44	629.15	346.94	55	20/20



Article

Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers

Marek Drozdziak ^{1,*}, Joanna Lapczuk-Romanska ¹, Christoph Wenzel ², Lukasz Skalski ¹, Sylwia Szeląg-Pieniek ¹, Mariola Post ³, Arkadiusz Parus ⁴, Marta Syczewska ⁵, Mateusz Kurzawski ⁶ and Stefan Oswald ⁷

¹ Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Pomeranian Medical University, 70-111 Szczecin, Poland

² Department of Pharmacology, Center of Drug Absorption and Transport, University Medicine Greifswald, 17489 Greifswald, Germany

³ Department of General and Transplantation Surgery, County Hospital, 71-455 Szczecin, Poland

⁴ Department of Mechatronics, West Pomeranian University of Technology, 70-310 Szczecin, Poland

⁵ Department of Infectious Diseases, Hepatology and Liver Transplantation, Pomeranian Medical University, 71-455 Szczecin, Poland

⁶ Laboratory of Pharmacodynamics, Pomeranian Medical University, 71-899 Szczecin, Poland

⁷ Institute of Pharmacology and Toxicology, Rostock University Medical Center, 18057 Rostock, Germany

* Correspondence: drozdziak@pum.edu.pl; Tel: +48-91-4661589; Fax: +48-91-4661600

Abstract: Hepatic drug metabolizing enzymes (DMEs), whose activity may be affected by liver diseases, are major determinants of drug pharmacokinetics. Hepatitis C liver samples in different functional states, i.e., the Child–Pugh class A ($n = 30$), B ($n = 21$) and C ($n = 7$) were analyzed for protein abundances (LC-MS/MS) and mRNA levels (qRT-PCR) of 9 CYPs and 4 UGTs enzymes. The protein levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, and CYP2D6 were not affected by the disease. In the Child–Pugh class A livers, a significant up-regulation of UGT1A1 (to 163% of the controls) was observed. The Child–Pugh class B was associated with down-regulation of the protein abundance of CYP2C19 (to 38% of the controls), CYP2E1 (to 54%), CYP3A4 (to 33%), UGT1A3 (to 69%), and UGT2B7 (to 56%). In the Child–Pugh class C livers, CYP1A2 was found to be reduced (to 52%). A significant trend in down-regulation of the protein abundance was documented for CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, UGT2B7, and UGT2B15. The results of the study demonstrate that DMEs protein abundances in the liver are affected by hepatitis C virus infection and depend on the severity of the disease.

Keywords: hepatitis C; liver; drug metabolizing enzymes

Citation: Drozdziak, M.; Lapczuk-Romanska, J.; Wenzel, C.; Skalski, L.; Szeląg-Pieniek, S.; Post, M.; Parus, A.; Syczewska, M.; Kurzawski, M.; Oswald, S. Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4543. <https://doi.org/10.3390/ijms24054543>

Academic Editor: Graça Soveral

Received: 22 December 2022

Revised: 22 February 2023

Accepted: 22 February 2023

Published: 25 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a small, enveloped RNA virus targeting hepatocytes, and its local replication and immune responses lead to liver damage, ultimately resulting in cirrhosis and/or hepatocellular carcinoma. The implementation of new treatment modalities, i.e., direct acting antiviral drugs (DAAs) have markedly improved therapeutic outcomes. However, the treatment success rate is determined by the HCV genotype, and its high rate and the erroneous nature of its viral replication result in a high prevalence of resistance-associated substitutions (with and without drug pressure) that may impact the efficacy of pharmacotherapy [1].

The currently available DAAs are subjected to metabolism via enzymes located mainly in the intestine and liver [2]. DAAs are substrates of cytochrome P450 (CYP)1A2—pibrentasvir, CYP2B6—velpatasvir, CYP2C8—dasabuvir, velpatasvir, CYP2C19—simeprevir, CYP3A4/5—glecaprevir, grazoprevir, voxilaprevir, daclatasvir, elbasvir, pibrentasvir, simeprevir, velpatasvir, and uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase

(UGT)1A1—pibrentasvir. Apart from being enzymatic substrates, some of the drugs produce inhibitory activity against enzymes, which complicates the enzyme/substrate/inhibitor interplay. The following are the enzymatic inhibitors: CYP1A2—glecaprevir, pibrentasvir; CYP3A4/5—asunaprevir, daclatasvir, dasabuvir, elbasvir, glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir, pibrentasvir, simeprevir, velpatasvir; and UGT1A1—glecaprevir, and pibrentasvir [3,4].

The summaries of product information of some DAAs define that safety and efficacy have not been studied in HCV-infected patients with moderate or severe hepatic impairment (Child–Pugh score B or C) due to ethical concerns and methodological challenges. However, the European Medicines Agency (EMA) and the United States of America Food and Drug Administration (FDA) regulations recommend pharmacokinetic studies in patients with impaired hepatic function when it is likely that liver dysfunction may significantly affect pharmacokinetics (especially metabolism and biliary excretion) and dose adjustments might be needed [5,6].

Therefore, quantitative information about drug metabolizing enzymes (DMEs) levels in HCV livers is of clinical relevance. In this regard, physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation may enable stratification of potential risks derived from the altered pharmacokinetics of administered drugs, prediction of oral drug bioavailability, and drug–drug interactions (DDIs). The findings of this study can be applied not only to agents targeting HCV, but also to other drugs (DMEs substrates) that are administered to patients with hepatitis C. This study provides information about DMEs proteomic data from only one pathological state of the liver stratified according to the Child–Pugh classification, and includes the largest number of cases published so far.

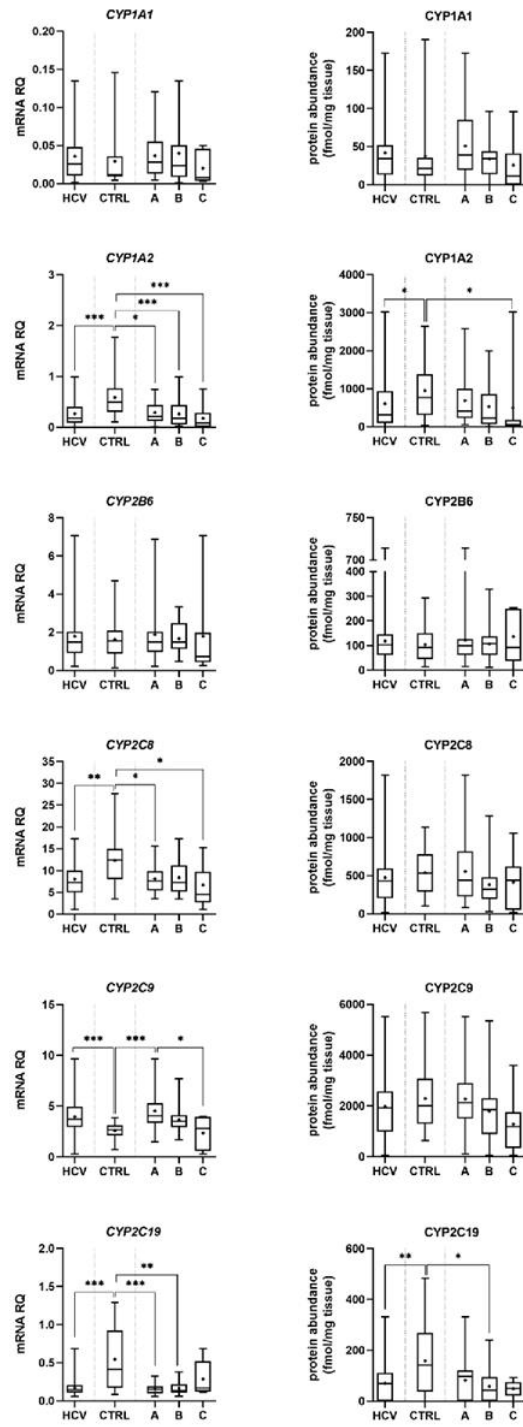
Our preliminary study revealed the impact of liver diseases on DMEs protein levels, and it included 21 cases of HCV livers (also used in the current analysis). The findings revealed that the disease entails significant decrease in CYP2E1, CYP3A5, and UGT2B7 protein abundance [7]. However, due to the limited number of cases, we could not analyze the data according to liver dysfunction stage. This study suggested that the protein abundance of DMEs was affected by both the type of liver pathology (hepatitis C, alcoholic liver disease, autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis, and primary sclerosing cholangitis) as well as the organ functional status (according to the Child–Pugh classification); however, in the latter analysis, samples with different liver pathologies were merged. The combined analysis of all liver pathologies suggested that the worsening of liver functions was associated with a significant decrease in protein abundance of CYP2E1 in class A, downregulation of CYP3A4 and UGT2B7 starting from class B, and CYP1A2, CYP2C8, and CYP2C9 appeared to be reduced in the Child–Pugh score C livers [7].

In the present study, we were able to substantially expand the number of HCV samples, which not only allowed us to provide quantitative proteomic (LC–MS/MS) data on DMEs status in HCV livers, but also to stratify DMEs expression levels according to the Child–Pugh classification, i.e., functional state of the liver. The information presented in this study is complementary to the findings on drug transporters in the liver in patients suffering from HCV infection, as the same subjects were included in the analysis [8].

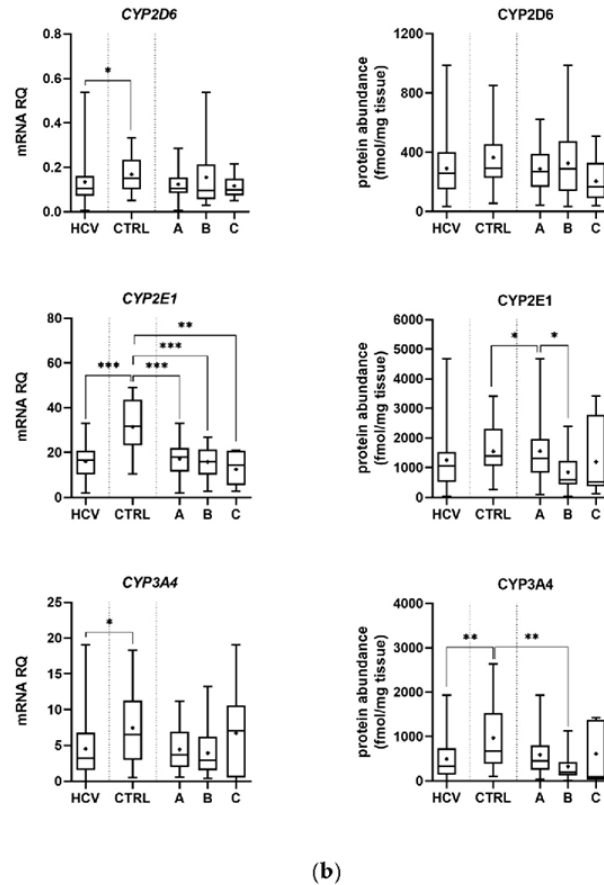
2. Results

2.1. mRNA Expression

In the control samples, a strong correlation ($r_s > 0.6$) between DMEs mRNA expression and protein abundance was observed. Only CYP2E1/CYP2E1 and CYP2C19/CYP2C19 did not demonstrate significant correlations (Table 1). However, HCV infection affected correlations between DMEs gene expression and protein levels, i.e., loss of strong correlation was seen in most enzymes, but in general the same trend in mRNA and protein abundance changes was observed (Table 1, Figures 1 and 2, Supplementary Tables S1 and S2).



(a)



(b)

Figure 1. Gene expression (left) and protein abundance (right) of CYPs in hepatitis C (HCV, $n = 58$) liver tissues stratified according to the Child–Pugh score into stages: A ($n = 30$), B ($n = 21$), and C ($n = 7$), and the controls (CTRL, $n = 20$). The data are represented as box-plots of the median (horizontal line), 75th (top of box) and 25th (bottom of box) quartiles, the smallest and largest values (whiskers) and mean (+). mRNA levels of the analyzed genes are expressed as relative amounts to the mean of five housekeeping genes (*GAPDH*, *HMBS*, *PPIA*, *RPLP0*, *RPS9*). Statistically significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Wilcoxon–signed rank test in comparison to the controls). (a) Results for CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9 and 2C19. (b) Results for CYP2D6, 2E1 and 3A4.

Table 1. Correlations (Spearman coefficient, r) between protein abundance and mRNA expression levels of CYPs and UGTs in HCV livers (HCV), HCV liver disease stages (Child–Pugh class A, B and C), as well as the controls.

Protein	mRNA vs. Protein Correlation Coefficient				
	Controls $n = 20$ ^a	HCV $n = 58$ ^b	Child–Pugh Class A $n = 30$ ^c	Child–Pugh Class B $n = 21$ ^d	Child–Pugh Class C $n = 7$ ^e
CYP1A1	0.664 ***	0.584 ***	0.638 ***	0.505 *	0.414
CYP1A2	0.824 ***	0.652 ***	0.517 **	0.642 **	0.571
CYP2B6	0.612 **	0.332 **	0.426 *	−0.003	0.786 *
CYP2C8	0.645 **	0.025	−0.078	−0.177	0.571
CYP2C9	0.620 **	0.202	0.238	−0.203	0.679
CYP2C19	0.325	−0.044	−0.010	−0.180	0.715
CYP2D6	0.586 **	0.357 **	0.468 *	0.389	−0.321
CYP2E1	0.352	0.118	0.321	−0.091	0.000

CYP3A4	0.889 ***	0.466 ***	0.400 *	0.348	0.714
UGT1A1	0.675 **	0.280 *	0.378 *	0.073	0.536
UGT1A3	0.699 ***	0.306 *	0.092	0.348	0.857 *
UGT2B7	0.800 ***	0.235	0.051	0.094	-0.214
UGT2B15	0.725 ***	0.317 *	0.295	-0.019	0.679

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; ^a CYP2C19 $n = 18$, CYP2D6 $n = 19$; ^b CYP2C19 $n = 57$, CYP2D6 $n = 55$; ^c CYP2D6 $n = 29$; ^d CYP2D6 $n = 19$; ^e CYP2C19 $n = 6$.

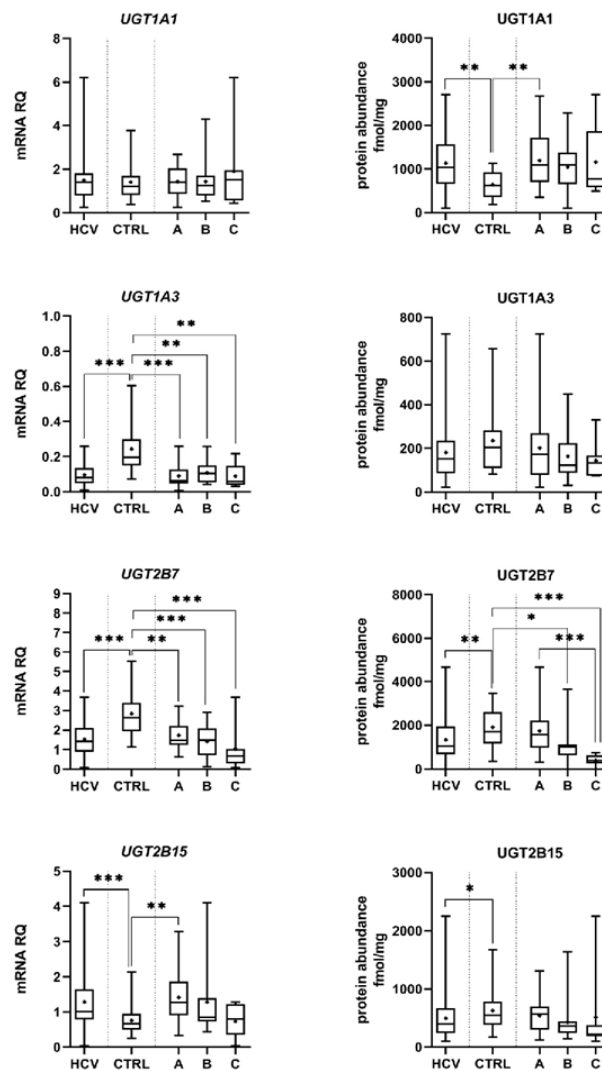


Figure 2. Gene expression (left) and protein abundance (right) of UGTs in hepatitis C (HCV, $n = 58$) liver tissues stratified according to the Child–Pugh score into stages: A ($n = 30$), B ($n = 21$), and C ($n = 7$), and the controls (CTRL, $n = 20$). The data are represented as box-plots of the median (horizontal line), 75th (top of box) and 25th (bottom of box) quartiles, the smallest and largest values (whiskers) and mean (+). mRNA levels of the analyzed genes are expressed as relative amounts to the mean of five housekeeping genes (*GAPDH*, *HMB5*, *PPIA*, *RPLP0*, *RPS9*). Statistically significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Wilcoxon–signed rank test in comparison to the controls).

2.2. Protein Abundance

Protein abundance levels of several enzymes were not significantly affected by HCV infection, i.e., CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A5. The Child–Pugh class A livers were characterized by significant up-regulation of UGT1A1 (to 163% of the controls). The Child–Pugh class B was associated with down-regulation of CYP2C19 (to 38% of the controls), CYP2E1 (to 54% of the controls), CYP3A4 (to 33% of the controls), UGT1A3 (to 69% of the controls), and UGT2B7 (to 56% of the controls). Significant reductions in CYP1A2 (to 52% of the controls) and UGT2B7 (to 20% of the controls) in the Child–Pugh stage C were also noted (Figures 1 and 2, Supplementary Table S2). The significant trend in the downregulation of CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1, UGT2B7, and UGT2B15 was documented.

The merged results of all HCV samples revealed that the disease did not significantly affect the protein levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, and UGT1A3 as compared to the control samples. Significant decrease in CYP1A2 (to 64% of the controls), CYP2C19 (to 45% of the controls), CYP3A4 (to 47% of the controls), and CYP3A5 (to 55% of the controls) as well as UGT2B7 (to 70% of the controls), UGT2B15 (to 79% of the controls), and marked increase in UGT1A1 (to 177% of the controls) abundances, were noted (Figures 1 and Figure 2, Supplementary Table S2).

The percentage contributions of all investigated CYPs proteins stratified according to the Child–Pugh score are given in Figure 3. The protein amounts decreased parallel to the disease progression, and the rank order of the enzymes was not markedly affected by the functional state of the liver. CYP2C9, CYP2E1, CYP1A2, and CYP3A4 showed the highest abundances, while CYP2B6, CYP1A1, and CYP2C19 were only found in traces (–1–2%) (Figure 3, Table S2).

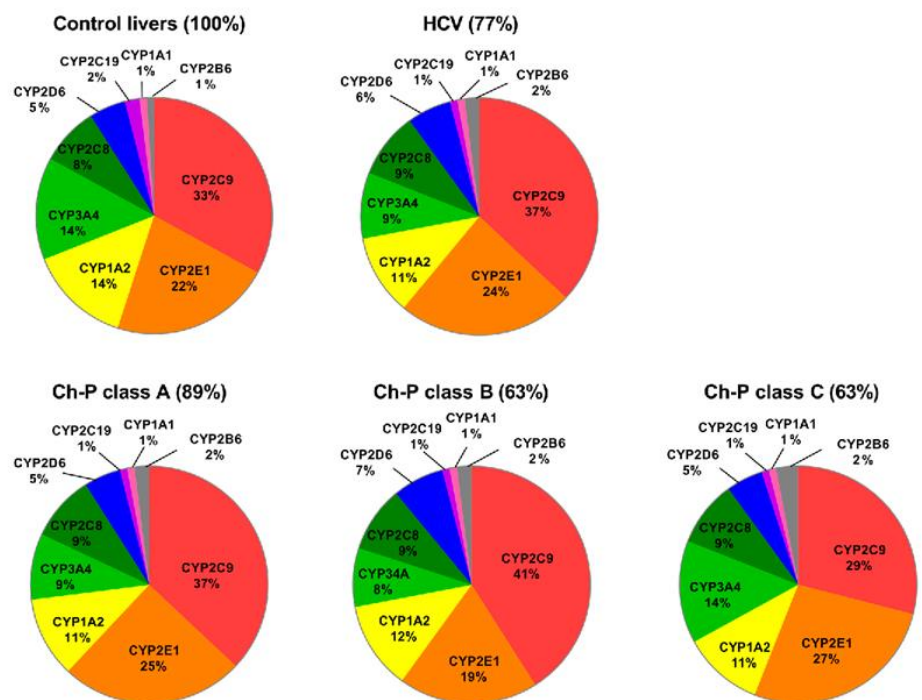


Figure 3. Pie charts of the individual enzyme protein amounts in HCV livers stratified according to the Child–Pugh score (A, B, and C class). The pie charts show the abundance of each enzyme as a percentage of the sum of all enzyme protein abundances. Percentages indicate a total enzyme protein abundance in comparison to the control livers (indicated as 100%).

The Jonckheere–Terpstra test evidenced a significant trend in the downregulation of CYP1A2 ($p = 0.012$), CYP2C9 ($p = 0.029$), CYP3A4 ($p = 0.019$), CYP2E1 ($p = 0.004$), UGT2B7 ($p = 0.0001$), and UGT2B15 ($p = 0.013$) protein abundances from class A to C classified livers.

2.3. Genotyping

Genotyping studies of *CYP2C19*, *CYP2D6*, and *CYP3A5* resulted in exclusion of samples genetically determined with the enzyme deficiency, i.e., *CYP2C19* – 2 controls, 1 HCV subject, and *CYP2D6* – 1 control, 3 HCV subjects. As for *CYP3A5* expression, 7 out of 58 HCV patients and 3 out of 20 control subjects were defined as expressers (*1/*3) with a protein abundance of 297.7 fmol/mg (± 259.0). The *CYP3A5* non-expressers (*3/*3) protein levels were defined at 39.6 fmol/mg (± 34.07).

3. Discussion

Information about the proteomic status of DMEs in the liver in its healthy and disease states provides insights into potential effects of liver pathologies on drug pharmacokinetics, and thus therapeutic responses as well as potential side effects. The correlation between DMEs mRNA and protein levels is not always satisfactory (in the present study it was especially affected by HCV infection). Therefore, reliable protein quantification information allows for better predictions than mRNA expression data. Our previous findings from studies including various liver pathologies (hepatic virus-induced liver damage, alcoholic liver disease, autoimmune hepatitis, primary biliary cholangitis, and primary sclerosing cholangitis) demonstrate a disconnection between the gene expression and protein abundance of DMEs [7].

So far, only limited information about the proteomic data of DMEs in relation to liver diseases has been published. The above-mentioned study [7], demonstrated that different liver pathologies affected various CYPs and UGTs. The HCV samples of the aforementioned study (21 samples are also included in the present analysis) demonstrated that the disease was associated with significant down-regulation of CYP2E1, CYP3A5, and UGT2B7 protein abundances (and unchanged levels of CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A3, and UGT2B15). Those results mostly corroborate the findings of the present study, but analysis of a larger number of cases also revealed significant protein abundance reduction in CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4, and UGT2B15, as well as a marked up-regulation of UGT1A1. These findings are supported by the proteomic (LC–MS/MS) analysis of Prasad et al. [9] for CYP2D6 (unchanged levels) as well as CYP1A2, CYP2E1, UGT2B7, and UGT2B15 (down-regulation) in 30 HCV liver specimens. The observed differences could be related to methodological specificities; however, they could also be related to analysis of liver tissues from patients with various stages of HCV liver disease (not defined in the study of Prasad et al. [9]).

The present study also provides as-of-yet unavailable information about the changes of DMEs in HCV livers in dependence on the organ functional stage (based on the Child–Pugh classification). Our previous study suggested that the stage of liver dysfunction (analyzed in the combined samples from five different liver pathologies) affected DMEs protein levels. In detail, the study revealed protein abundance down-regulation of CYP2E1 in class A livers, decreased levels of CYP2E1 and CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and UGT2B7 in class B, as well as reduction in CYP2E1, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, and CYP1A2, CYP2C9 in the class C tissues [7]. However, these findings, as stated above, are based on the merged results of five liver pathologies, with various contributions to each Child–Pugh class. Thus, the advantage of the current study relies on the analysis of only one liver pathology, i.e., HCV. The results of the present study indicate that the Child–Pugh class A livers are characterized by significant up-regulation of UGT1A1, the class B livers by down-regulation of CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4, UGT1A3, and UGT2B7, as well as the class C livers by significant reduction in CYP1A2 and UGT2B7.

The present analysis provides evidence that progression of liver dysfunction produced by HCV infection is associated with constant down-regulation of DMEs. The range of protein abundance changes were in most cases over two-fold, which suggested potential clinical relevance. The results of the present study can be used to explain pharmacokinetic changes observed in HCV infected patients [10]. This study demonstrated that CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, and CYP2E1 enzyme activity was differentially affected by the presence of liver disease. The activity of all enzymes decreased significantly, but the reduction depended on the organ functional state. However, Frye et al. did not specify underlying liver pathology, and stratified subjects according to the Child–Pugh classification into compensated liver disease (Child–Pugh score of 5) or decompensated liver disease (Child–Pugh score ≥ 6) [10]. Our quantitative proteomic data are in keeping with altered enzymatic activity in the liver disease patients, e.g., lower (40%) chlorzoxazone (CYP2E1 substrate) metabolic ratio in patients with moderate–severe liver disease, significantly (69%) lower caffeine (CYP1A2 substrate) metabolic ratio in decompensated liver disease (Pugh score ≥ 6), and no effects on the drug pharmacokinetics of the compensated disease (Pugh score =5) [10]. From this perspective, the current study findings are in keeping with clinical data on metabolic ratios of probe substrates for the studied enzymes (i.e., CYP1A2, CYP2C19, and CYP2E1) [10]. The CYP3A4 results of the present study are in line with clinical observations on midazolam (CYP3A4 substrate) pharmacokinetics reported by Pentikäinen, who demonstrated significantly higher oral bioavailability (38%) and 41% lower total clearance of the drug (and unchanged plasma protein binding and distribution) in patients with chronic liver disease (with undefined etiology) [11]. The pharmacokinetic study, which revealed unaltered pharmacokinetics of debrisoquine (substrate of CYP2D6) in mild or moderate (Child–Pugh classification) liver disease patients also corroborate our results. However, reduced urinary excretion of 4-hydroxydebrisoquine in patients with the liver disease was also observed [12].

The present study also demonstrated significantly elevated protein levels of UGT1A1 in Child–Pugh class A livers, and this observation is not in keeping with the study of Prasad et al. [9], who reported UGT1A1 to be below the lower limit of quantification in livers infected with HCV. However, our finding fits to the changes in the gene expression reported by Congiu et al. [13]. The latter study revealed higher levels of UGT1A1 in early stages of liver fibrosis; however, they noted down-regulation in more advanced stages of the disease. In the present study, mRNA UGT1A1 levels in the liver were similar in all Child–Pugh classes. Clinical pharmacokinetic study suggests that glucuronidation pathways are not affected by liver diseases (revised in [14]), which is also supported by the stable protein levels of UGT1A3 and UGT1A1 in the Child–Pugh class B and C HCV livers revealed in this study. However, in most studies reporting preservation of drug glucuronidation only patients with mild to moderate liver disease were recruited. More recent reports have revealed that some glucuronidation pathways could be down-regulated in more advanced stages of liver failure. Our study demonstrated lower levels of UGT2B7 and UGT2B15 in HCV affected livers, especially in the Child–Pugh class C livers. These findings may explain the reduced glucuronidation of morphine (UGT2B7) [15], lamotrigine (UGT1A4, UGT2B7) [16], zidovudine (UGT2B7) [17], mycophenolic acid (UGT1A9, UGT2B7) [18], or oxazepam (UGT2B15) [19] in patients with liver dysfunction. However, those studies might not identify the effects of the disease on individual UGT isoforms levels, since the substrate overlap of UGTs activity is frequently observed.

The protein abundance of DMEs in the control group from the present study are mostly in keeping with the results of other reports. It should be stated that the control liver source can (to some extent) affect results. The preliminary study compared DMEs protein abundances in organ donor livers and metastatic livers (used in studies as reference/control values) and demonstrated some differences [20]. The type of specimen analyzed, i.e., whole liver tissue or microsomal fraction applied for proteomic analysis [21], along with tissue preservation process [22] as well as methodological issues [23,24], can also produce some discrepancies. In the present study, the control group results of the

most abundant CYPs (CYP2C9, CYP2E1, and CYP3A4) in metastatic livers free from pathological changes are in line with Vasiliogianni et al.'s targeted proteomics results, but measured in microsomal fraction [25], and Couto et al., who measured CYPs in microsomal fraction using a global proteomic approach in the same type of control (metastatic liver) tissues [26].

In the current study, only Caucasian liver samples were included so that we could exclude the ethnic bias. In the literature the impact of ethnicity on drug pharmacokinetics was postulated, suggesting indirect differences in DMEs levels/activities [27]. Some of the inter-ethnic differences can be ascribed to genetic polymorphisms, which affect protein levels or enzymatic activity, e.g., higher frequencies of CYP3A5 allele expression (CYP3A5*3, CYP3A5*6, and CYP3A5*7) in African Americans compared to individuals of European, Native American, and Asian ancestry (affecting pharmacokinetics of tacrolimus) [28] or higher number of the slow metabolizer of CYP2B6 516 G > T allele in Africans Americans (46.7%) and Sub-Saharan Africans (45%) compared to Asians (17.4%), Hispanics (17.4%), Japanese (18%), and Caucasians (21.4%) (affecting efavirenz or atazanavir pharmacokinetics) [29,30]. In the present study 7 out of 58 HCV patients and 3 out of 20 control subjects were defined as expressers of CYP3A5 (*1/*3 genotype) with protein abundance levels of 297.7 fmol/mg (± 259.0), in comparison to 39.6 fmol/mg (± 34.07) in non-expressers (*3/*3 genotype). However, there is a paucity of expression and protein abundance information about DMEs in different ethnic groups. The available data suggest that ethnic origin does not have a substantial impact on DMEs levels [31]. It seems that nongenetic factors such as diet, weight, and environmental factors should be also highlighted as potential sources of inter-individual variation in drug pharmacokinetics. There is also evidence of age-dependent changes in the expression levels, protein abundances, and activities of DMEs [32,33]. However, our study groups are age-similar, and the impact of age on the results can be disregarded.

The changes in the DMEs expression/abundance can be, in part, ascribed to altered cytokine status produced by HCV infection in the liver. Hepatitis C is an inflammatory disease associated with elevated expression levels of IL(interleukin)-6 and TNF(tumor necrosis factor)- α [34]. It is also documented that liver-infiltrating T cells from chronic hepatitis C patients produced IFN(interferon)- γ [35], apoptotic hepatocytes released IL-1 α [36], and macrophages exposed to HCV secreted IL-1 β and IL-18 [37]. These cytokines could be involved in the transcriptional regulation of some DMEs and may explain the expression/abundance changes observed in the present study. Human hepatocyte culture experiments demonstrated that IL-6 exposure resulted in the down-regulation of genes coding for CYP3A4 and CYP2B6, as well as up-regulation of CYP1A2. This study did not evidence any impact of IL-1 β , and no synergism between IL-6 and IL-1 β on the CYPs genes expression [38]. The exposure of HepaRG cells to IL-6 produced the suppression of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA levels. Similar findings on CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA expressions were observed in primary hepatocytes [39]. However, no suppression of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNAs after exposure to IL-18 and IL-1 β was observed [38,39]. The TNF- α suppressed expression of *cyp1a1* gene in the hepatocyte cell line Hepa1c1c7 [40], and IFN- γ induced down-regulation of CYP1A2 and CYP3A4 expression in human hepatocytes [41]. The down-regulation of transcription factors such as hepatocyte nuclear factors (HNFs), NF(nuclear factor)- κ B, along with several nuclear receptors such as pregnane X receptor (PXR) and constitutive androgen receptor (CAR), have been proposed to be responsible for suppression of the CYPs expression by inflammatory stimuli [40,42,43]. It was shown that PXR was involved in the IL-6-mediated down-regulation of CYP3A4 in HepG2 cells [44], and IL-1 mediated regulation of CYP3A4, with possible contribution of HNF(hepatocyte nuclear factor)4 [45]. An involvement of NF- κ B in the down-regulation of CYP1A1/1A2 expression in hepatocytes was also reported [40]. Furthermore, PXR and CAR could also regulate phase II enzymes in hepatocytes [46]. However, not all results of the present study are in keeping with in vitro and

ex vivo experimental findings; contrary results have also emerged from those reports, most likely due to different cell models, culture conditions, or experimental protocols.

The present study results can be also used to better scale PBPK models of DAAs, as there is missing information about pharmacokinetics in HCV patients with advanced liver disease (especially in Child–Pugh class C subjects). The study findings are in keeping with the available pharmacokinetic data and recommendations specified in the summaries of product information of DAAs. The significantly down-regulated levels of CYP1A2 (and CYP3A4 and UGT1A1) could explain the altered pharmacokinetics of pibrentasvir, whose area under the concentration–time curve (AUC) differed by 26% or less in patients with Child–Pugh class A or B cirrhosis and increased to 2.1-fold for those with class C [47].

The protein levels of CYP2B6 were not affected by the stage of liver failure. Velpatasvir is metabolized via this enzymatic pathway (also via CYP2C8 and CYP3A4), and its pharmacokinetics was not affected by liver dysfunction, which supports the proteomic findings of the present study. The drug AUC was comparable in non-HCV Child–Pugh classes B and C patients with normal hepatic function subjects [48].

The CYP2C8 protein abundance, similar to CYP2B6, was not altered in the samples from HCV-infected patients. The enzyme contributes to dasabuvir (and as stated above of velpatasvir) metabolism. The AUC values of dasabuvir were similar in healthy subjects and the Child–Pugh class A patients. However, in the Child–Pugh class B patients a 16% AUC reduction of the drug was observed, which was paralleled by a 57% decrease in M1 (major metabolite) AUC values. The class C subjects were characterized by elevated AUCs for dasabuvir (325%) and M1 (77%) [49]. According to the summary of product characteristics, dasabuvir should not be administered to the Child–Pugh class B and C patients. The down-regulation in CYP2C8 protein levels in the liver could contribute to the observed changes in the drug pharmacokinetics.

The pharmacokinetic information about simeprevir, a CYP2C19 substrate (also a substrate of CYP3A4 and CYP2C8) in liver dysfunction patients is not equivocal. Sekar et al. [50] observed equal AUC in non-HCV Child–Pugh class A and B subjects. Other trials reported two-fold higher AUC in non-HCV Child–Pugh class B and C patients [51] or 2.4- and 5.2-fold AUC increases in the Child–Pugh class B and C patients, respectively, compared to healthy individuals. However, contribution of CYP3A4 down-regulation to the observed changes cannot be excluded. Therefore, simeprevir should not be used in Child–Pugh class C patients and caution should be taken with Child–Pugh class B subjects, as stated in the manufacturer recommendations [52]. The reported alterations in simeprevir pharmacokinetic characteristics can be considered to be in keeping with the protein abundance changes observed in the present study, since the down-regulation of CYP2C19 protein abundance was found, significant from the Child–Pugh class B.

The documentation in the present study of significant down-regulation of CYP3A4 levels are in line with pharmacokinetic studies and recommendations for the clinical use of elbasvir/grazoprevir, glecaprevir/pibrentasvir, and sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (all agents, except for sofosbuvir, are substrates of CYP3A4). Clinical guidelines mark those combined medications as not recommended or contraindicated in the Child–Pugh class B and C patients (also due to unavailability of the relevant data). Results of pharmacokinetic studies are in part inconsistent (due to complexity of factors affecting drug kinetics in liver failure patients) with the present study findings; however, some could indicate reduced CYP3A4 metabolic capacity of the liver, i.e., increased steady-state exposure and C_{max} of grazoprevir changing with the Child–Pugh class [53] or pibrentasvir (also a substrate for CYP1A2 down-regulated in the present study) AUC increase by 51%, 31%, and 5.2-fold in patients with the Child–Pugh A, B, and C, respectively [47]. Other substrates of CYP3A4, i.e., daclatasvir or elbasvir are highly protein bound (>99%) and characterized by a low hepatic extraction ratio. Therefore, liver function deterioration could not influence the unbound fraction of daclatasvir in the Child–Pugh class B and C patients,

in comparison with HCV-infected controls [3]. Likewise, elbasvir exposure was comparable in HCV patients with Child–Pugh class B liver cirrhosis and healthy controls [54].

In addition to disease-related changes in the protein abundance of distinct CYP enzymes as investigated in our study, the applied pharmacotherapy in HCV patients may be affected by the inhibitory potential of several DAAs, i.e., CYP1A2—glecaprevir, pibrentasvir; CYP3A4/5—asunaprevir, daclatasvir, dasabuvir, elbasvir, glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir, pibrentasvir, simeprevir, velpatasvir; and UGT1A1—glecaprevir, pibrentasvir [3,4]. This information is of importance as some of these agents are available as fixed-dose combinations, e.g., elbasvir/grazoprevir or glecaprevir/pibrentasvir. This information, apart from CYPs protein abundance levels, should be implemented in the construction of PBPK models.

4. Materials and Methods

4.1. Liver Samples

The control samples were harvested from metastatic livers, from a site at least 5 cm distance of the tumor site. The tissues were collected from Caucasian patients, aged 63 ± 10 years, 11 males and 9 females, diagnosed with metastatic colon cancer. The collected tissues did not show any pathological signs as confirmed by histological examination (the samples were used as the controls in the previously published study [7]).

HCV (diagnosed according to the standard clinical criteria) liver parenchymal tissue samples were dissected from the patients requiring liver transplantation. The liver tissue specimens were harvested during elective liver transplantation from the organ immediately after excision. The stage of liver dysfunction was classified according to the Child–Pugh score. Characteristics of the subjects are presented in Table 2. The whole medication information is available for the control samples, i.e., one patient was treated with bisoprolol, furosemide, and tamsulosin (hypertension and prostate hypertrophy), one was treated with bepridil (hypertension), and another one was medicated with amlodipine (hypertension). None of these drugs are known to be a potent regulator of CYP or UGT enzymes. The HCV liver samples were collected in the years 2007–2019, and treatment standards for HCV were modified several times in this period, which is a limitation of the samples. We were only able to select samples without co-existing co-morbidities.

Table 2. Characteristics of the subjects (mean \pm SD).

Parameter/Disease	Control <i>n</i> = 20	HCV <i>n</i> = 58	Ch-P A <i>n</i> = 30	Ch-P B <i>n</i> = 21	Ch-P C <i>n</i> = 7
Sex [male/female]	11/9	30/28	16/14	11/10	3/4
Age [years]	63 \pm 10	56 \pm 7	57 \pm 7	55 \pm 8	52 \pm 9
Total bilirubin [mg/dL]	0.59 \pm 0.25	1.75 \pm 1.26	1.03 \pm 0.57	2.05 \pm 0.84	3.62 \pm 1.78
Albumin [g/dL]	3.89 \pm 0.38	3.38 \pm 0.57	3.67 \pm 0.49	3.23 \pm 0.45	2.71 \pm 0.40
INR	1.14 \pm 0.21	1.30 \pm 0.28	1.20 \pm 0.22	1.29 \pm 0.17	1.71 \pm 0.36

HCV—hepatitis C; Ch–P: A, B, C—Child–Pugh Class A, B, C; INR—International Normalized Ratio.

Tissue biopsies were taken from livers (control and pathological) under standard general anesthesia not later than 15 min after blood flow arrest. The liver samples were immediately snap-frozen in liquid nitrogen for protein analysis or immersed in RNAlater (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) for RNA analysis, and then stored at -80 °C. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the Pomeranian Medical University.

4.2. mRNA Isolation and Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA was isolated from 25 mg of each tissue sample using a Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). RNA concentration and purity was assessed using a DS-11 FX spectrophotometer (Denovix, Wilmington, DE, USA). cDNA was prepared using a SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), with 500 ng of total RNA for 20 µL of reaction volume, according to the manufacturer's procedure. The gene expression levels were examined in duplicate using TaqMan Fast Advanced Master Mix and pre-validated TaqMan assays: CYP1A1 (Hs00153120_m1), CYP1A2 (Hs00167927_m1), CYP2B6 (Hs03044631_m1), CYP2C8 (Hs02383390_s1), CYP2C9 (Hs02383631_s1), CYP2C19 (Hs00426380_m1), CYP2D6 (Hs00164385_m1), CYP2E1 (Hs00559367_m1), CYP3A4 (Hs00604506_m1), CYP3A5 (Hs01070905_m1), UGT1A1 (Hs02511055_s1), UGT1A3 (Hs04194492_g1), UGT2B7 (Hs00426592_m1), UGT2B15 (Hs00870076_s1) in ViiA 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, Waltham, MA, USA). Threshold values for each gene were set manually and mean C_T (cycles of threshold) values were recorded. Relative mRNA expression was calculated by the $2^{-\Delta C_T}$ method, which was normalized to the mean expression value obtained for the housekeeping genes: GAPDH (Hs99999905_m1), HMBS (Hs00609297_m1), PPIA (Hs04194521_s1), RPLP0 (Hs99999902_m1), RPS9 (Hs02339424_g), and by $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, which was additionally normalized to the mean value for the control group.

4.3. Genotyping

Genomic DNA was extracted from tissue samples using a Tissue DNA Purification Kit (EURx, Gdansk, Poland) and subsequently standardized to a uniform concentration (20 ng/µL) before being stored at -20°C . All samples were genotyped for common lack-of-function variants affecting protein concentration (i.e., stop-codons, frameshifts, and splicing defects) using ViiA7 Fast Real-Time PCR System and pre-validated TaqMan assays (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The following variants were evaluated: CYP2C19*2 (rs4244285, Assay ID: C_25986767_70), CYP2D6*3 (rs35742686, C_32407232_50), CYP2D6*4 (rs3892097, C_27102431_D0), and CYP3A5*3 (rs776746, C_26201809_30). Additionally, CYP2D6 gene deletion (CYP2D6*5) was evaluated using the qPCR method with TaqMan probes for CYP2D6 (Hs00010001_cn) and reference RPPH1 gene.

4.4. Protein Quantification by LC-MS/MS

Tissues placed in liquid nitrogen were mechanically disrupted in a stainless-steel mortar system. Approximately 40 mg of tissue powder of each sample was lysed with 1 mL of 0.2% SDS and 5 mM of EDTA containing 5 µL/mL of Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min at 4°C on a platform shaker with 40 rpm (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Germany). Total protein content of the whole tissue lysates was determined by bicinchoninic acid assay (BCA, Thermo Fisher) and 100 µg of each sample was processed using a filter aided sample preparation (FASP) [55]. Protein quantification of nine CYP (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, and CYP3A5) and four UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7, and UGT2B15) enzymes were measured by mass spectrometry-based targeted proteomics using the validated LC-MS/MS method [56]. With the exception of UGT1A3, an additional proteospecific peptide was analyzed for each protein in the same manner as the 13 validated peptides (i.e., 2 proteospecific peptides have been used for each enzyme). One peptide was used for quantification whereas the other served as a qualifier for the presence of the specific protein. For all peptides and their isotope-labeled internal standard peptides, three mass transitions were used, respectively. The calculated protein values represent the mean of at least 2–3 mass transitions/peptide. The final protein abundance for each enzyme was normalized to the individual mass of tissue used in the tryptic digest (fmol/mg).

4.5. Statistical Analysis

The mRNA and protein expression data were means \pm standard deviation and coefficient of variation %. The median as well as minimum and maximum values are given in Tables S1 and S2 of Supplementary Information. Differences between the study groups were evaluated using the nonparametric Kruskal–Wallis test for multiple comparisons with the post hoc Dunn’s test, and correlations with the Spearman rank test. The Jonckheere–Terpstra test for ordered differences was used to determine the significance of a trend in protein abundance along the liver functional state (using the Child–Pugh classification). The *p* values of <0.05 were considered significant. The statistical calculations were performed using Statistica 13.3 Software Package (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

5. Conclusions

In conclusion, it can be stated that the study provides information about the proteomic data of clinically relevant DMEs in hepatitis C-infected livers, also in relationship to the disease stage classified according to the Child–Pugh score. The disease significantly down-regulated the protein abundance of CYP1A2, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4, UGT2B7, and UGT2B15. The levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, as well as UGT1A3, remained stable, whereas the protein amount of UGT1A1 was up-regulated. DMEs down-regulation mostly developed in the Child–Pugh class B (only CYP1A1 started to be decreased in the class C). The rank order of the enzymes was not markedly affected by the liver functional states, i.e., CYP2C9, CYP2E1, CYP1A1, and CYP3A4 showed the highest abundances, while CYP2B6, CYP1A1, and CYP2C19 were found in trace amounts (~ 1 –2%). These findings indicate that the HCV liver has preserved capacity of drug metabolism in the Child–Pugh class A stage. The results from the present study can be incorporated into PBPK models in order to get more precise predictions of drug pharmacokinetics or drug–drug interactions and thus appropriate drug dose-adjustments in patients with HCV liver dysfunction. Refinement of the existing models can be of special importance for drugs where their clinical application is currently limited to mild stages of HCV liver disease (e.g., prescription of ombitasvir/paritaprevir/ritonavir or dasabuvir is restricted to the Child–Pugh score A, since the efficacy and safety of these agents were not studied in the Child–Pugh score B and C patients). This approach can open, based on more adequate estimations, clinical studies on drugs not registered for application in patients with advanced liver diseases since, for ethical reasons and risks, such trials without sufficient entry data are not implemented. The results of the present study can be combined with the findings on drug transporters protein abundances in the same set of HCV patients [8]. The combined picture of DMEs and transporters in the pathological livers can contribute to building PBPK models in HCV patients.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24054543/s1>.

Author Contributions: M.D. and S.O. wrote the article; M.D., M.K. and S.O. designed the research; M.D., J.L.-R., C.W., M.P., L.S., S.S.-P., A.P., M.K., M.S. and S.O. performed the research; M.D., J.L.-R., A.P., M.K. and S.O. analyzed the data. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the Minister of Science and Higher Education (Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022, project number 002/RID/2018/19, amount of financing 12,000,000 PLN), and the National Science Centre, Cracow, Poland UMO-2020/37/B/NZ7/01466.

Institutional Review Board Statement: The study has been approved by the by Bioethics Committee at the Pomeranian Medical University, approval number BN-001/11/07. The tissue samples were collected from participants who had provided informed consent. The study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (2013).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Esposito, I.; Trinks, J.; Soriano, V. Hepatitis C virus resistance to the new direct-acting antivirals. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.* **2016**, *12*, 1197–1209.
2. Drozdziak, M.; Busch, D.; Lapczuk, J.; Müller, J.; Ostrowski, M.; Kurzawski, M.; Oswald, S. Protein Abundance of Clinically Relevant Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver and Intestine: A Comparative Analysis in Paired Tissue Specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2018**, *104*, 515–524.
3. Smolders, E.J.; de Kanter, C.; van Hoek, B.; Arends, J.; Drenth, J.; Burger, D.M. Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of Hepatitis C Virus Drugs in Patients with Liver and/or Renal Impairment. *Drug Saf.* **2016**, *39*, 589–611.
4. Smolders, E.J.; Jansen, A.; Ter Horst, P.; Rockstroh, J.; Back, D.J.; Burger, D.M. Viral Hepatitis C Therapy: Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations: A 2019 Update. *Clin. Pharmacokinet.* **2019**, *58*, 1237–1263.
5. European Medicines Agency 2005. Guideline on the Evaluation of the Pharmacokinetics of Medicinal Products in Patients with Impaired Hepatic Function. February 2005 [Online]. Available online: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-evaluation-pharmacokinetics-medicinal-products-patients-impaired-hepatic-function_en.pdf (accessed on 4 December 2022).
6. FDA. Guidance for Industry Pharmacokinetics in Patients with Impaired Hepatic Function: Study, Design, Data Analysis, and Impact on Dosing and Labeling. 2003. Available online: <https://www.fda.gov/media/71311/download> (accessed on 4 December 2022).
7. Drozdziak, M.; Lapczuk-Romanska, J.; Wenzel, C.; Szelaż-Pieniek, S.; Post, M.; Skalski, Ł.; Kurzawski, M.; Oswald, S. Gene Expression and Protein Abundance of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes in Liver Pathology. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1334.
8. Drozdziak, M.; Lapczuk-Romanska, J.; Wenzel, C.; Skalski, Ł.; Szelaż-Pieniek, S.; Post, M.; Syczewska, M.; Kurzawski, M.; Oswald, S. Protein Abundance of Drug Transporters in Human Hepatitis C Livers. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7947.
9. Prasad, B.; Bhatt, D.K.; Johnson, K.; Chapa, R.; Chu, X.; Salphati, L.; Xiao, G.; Lee, C.; Hop, C.; Mathias, A.; et al. Abundance of Phase 1 and 2 Drug-Metabolizing Enzymes in Alcoholic and Hepatitis C Cirrhotic Livers: A Quantitative Targeted Proteomics Study. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46*, 943–952.
10. Frye, R.F.; Zgheib, N.K.; Matzke, G.R.; Chaves-Gnecco, D.; Rabinovitz, M.; Shaikh, O.S.; Branch, R.A. Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2006**, *80*, 235–245.
11. Pentikäinen, P.J.; Välisalmi, L.; Himberg, J.L.; Crevoisier, C. Pharmacokinetics of midazolam following intravenous and oral administration in patients with chronic liver disease and in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *29*, 272–277.
12. Adedoyin, A.; Arns, P.A.; Richards, W.O.; Wilkinson, G.R.; Branch, R.A. Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: Investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1998**, *64*, 8–17.
13. Congiu, M.; Mashford, M.L.; Slavin, J.L.K.; Desmond, P.V. UDP Glucuronosyltransferase mRNA Levels in Human Liver Disease. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 129–134.
14. Verbeeck, R.K. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *64*, 1147–1161.
15. Crotty, B.; Watson, K.J.; Desmond, P.V.; Mashford, M.L.; Wood, L.J.; Colman, J.; Dudley, F.J. Hepatic extraction of morphine is impaired in cirrhosis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *36*, 501–506.
16. Marcellin, P.; de Bony, F.; Garret, C.; Altman, C.; Boige, V.; Castelnau, C.; Laurent-Puig, C.; Trinchet, J.C.; Rolan, P.; Chen, C.; et al. Influence of cirrhosis on lamotrigine pharmacokinetics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *51*, 410–414.
17. Taburet, A.M.; Naveau, S.; Zorza, G.; Colin, J.N.; Delfraissy, J.F.; Chaput, J.C.; Singlas, E. Pharmacokinetics of zidovudine in patients with liver cirrhosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1990**, *47*, 731–739.
18. Parker, G.; Bullingham, R.; Kamm, B.; Hale, M. Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 332–344.
19. Sonne, J.; Boesgaard, S.; Poulsen, H.E.; Loft, S.; Hansen, J.M.; Døssing, M.; Andreasen, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxazepam and metabolism of paracetamol in severe hypothyroidism. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *30*, 737–742.
20. Kurzawski, M.; Szelaż-Pieniek, S.; Lapczuk-Romańska, J.; Wrzesiński, M.; Oswald, S.; Drozdziak, M. The reference liver-CYP450 and UGT enzymes in healthy donor and metastatic livers: The impact of genotype. *Pharmacol. Rep.* **2022**, *74*, 204–215.
21. Michaels, S.; Wang, M.Z. The revised human liver cytochrome P450 “Pie”: Absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 1241–1251.
22. Hansen, J.; Palmfeldt, J.; Pedersen, K.W.; Funder, A.D.; Frost, L.; Hasselström, J.B.; Jomil, J.R. Postmortem protein stability investigations of the human hepatic drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes CYP1A2 and CYP3A4 using mass spectrometry. *J. Proteom.* **2019**, *194*, 125–131.
23. Meyer, J.G.; Schilling, B. Clinical applications of quantitative proteomics using targeted and untargeted data-independent acquisition techniques. *Expert Rev. Proteom.* **2017**, *14*, 419–429.

24. Wegler, C.; Gaugaz, F.Z.; Andersson, T.B.; Wiśniewski, J.R.; Busch, D.; Gröer, C.; Oswald, S.; Norén, A.; Weiss, F.; Hammer, H.S.; et al. Variability in Mass Spectrometry-based Quantification of Clinically Relevant Drug Transporters and Drug Metabolizing Enzymes. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 3142–3151.
25. Vasilogianni, A.M.; Al-Majdoub, Z.M.; Achour, B.; Peters, S.A.; Rostami-Hodjegan, A.; Barber, J. Proteomics of colorectal cancer liver metastasis: A quantitative focus on drug elimination and pharmacodynamics effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2022**, *88*, 1811–1823.
26. Couto, N.; Al-Majdoub, Z.M.; Achour, B.; Wright, P.C.; Rostami-Hodjegan, A.; Barber, J. Quantification of Proteins Involved in Drug Metabolism and Disposition in the Human Liver Using Label-Free Global Proteomics. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 632–647.
27. Olafuyi, O.; Parekh, N.; Wright, J.; Koenig, J. Inter-ethnic differences in pharmacokinetics-is there more that unites than divides? *Pharmacol. Res. Perspect.* **2021**, *9*, e00890.
28. Mohamed, M.E.; Schladt, D.P.; Guan, W.; Wu, B.; van Setten, J.; Keating, B.J.; Iklé, D.; Rimmel, R.P.; Dorr, C.R.; Mannon, R.B. et al. Tacrolimus troughs and genetic determinants of metabolism in kidney transplant recipients: A comparison of four ancestry groups. *Am. J. Transplant.* **2019**, *19*, 2795–2804.
29. Naidoo, P.; Chetty, V.V.; Chetty, M. Impact of CYP polymorphisms, ethnicity and sex differences in metabolism on dosing strategies: The case of efavirenz. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2014**, *70*, 379–389.
30. Kile, D.A.; MaWhinney, S.; Aquilante, C.L.; Rower, J.E.; Castillo-Mancilla, J.R.; Anderson, P.L. A population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis of atazanavir. *AIDS Res Hum. Retrovir.* **2012**, *28*, 1227–1234.
31. Liu, J.; Cui, J.Y.; Lu, Y.F.; Corton, J.C.; Klaassen, C.D. Sex-, Age-, and Race/Ethnicity-Dependent Variations in Drug-Processing and NRF2-Regulated Genes in Human Livers. *Drug Metab. Dispos.* **2021**, *49*, 111–119.
32. van Groen, B.D.; Nicolai, J.; Kuik, A.C.; Van Cruchten, S.; van Peer, E.; Smits, A.; Schmidt, S.; de Wildt, S.N.; Allegaert, K.; De Schaepe-drijver, L.; et al. Ontogeny of Hepatic Transporters and Drug-Metabolizing Enzymes in Humans and in Nonclinical Species. *Pharmacol. Rev.* **2021**, *73*, 597–678.
33. Achour, B.; Barber, J.; Rostami-Hodjegan, A. Expression of hepatic drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes and their intercorrelations: A meta-analysis. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 1349–1356.
34. Hsia, C.Y.; Huo, T.I.; Chiang, S.Y.; Lu, M.F.; Sun, C.L.; Wu, J.C.; Lee, P.C.; Chi, C.W.; Lui, W.Y.; Lee, S.D. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2007**, *33*, 208–212.
35. Bertoletti, A.; D’Elios, M.M.; Boni, C.; De Carli, M.; Zignego, A.L.; Durazzo, M.; Missale, G.; Penna, A.; Fiaccadori, F.; Del Prete, G.; et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* **1997**, *112*, 193–199.
36. Sakurai, T.; He, G.; Matsuzawa, A.; Yu, G.Y.; Maeda, S.; Hardiman, G.; Karin, M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 156–165.
37. Shrivastava, S.; Mukherjee, A.; Ray, R.; Ray, R.B. Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J. Virol.* **2013**, *87*, 12284–12290.
38. Dickmann, L.J.; Patel, S.K.; Wienkers, L.C.; Slatter, J.G. Effects of interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-1 β /interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 930–937.
39. Rubin, K.; Janefeldt, A.; Andersson, L.; Berke, Z.; Grime, K.; Andersson, T.B. HepaRG cells as human-relevant in vitro model to study the effects of inflammatory stimuli on cytochrome P450 isoenzymes. *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43*, 119–125.
40. Ke, S.; Rabson, A.B.; Germino, J.F.; Gallo, M.A.; Tian, Y. Mechanism of suppression of cytochrome P-450 1A1 expression by tumor necrosis factor- α and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39638–39644.
41. Donato, M.T.; Guillén, M.I.; Jover, R.; Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J. Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P450 by interferon-gamma in human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *281*, 484–490.
42. Beigneux, A.P.; Moser, A.H.; Shigenaga, J.K.; Grunfeld, C.; Feingold, K.R. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 145–149.
43. Wang, X.; Rao, J.; Tan, Z.; Xun, T.; Zhao, J.; Yang, X. Inflammatory signaling on cytochrome P450-mediated drug metabolism in hepatocytes. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1043836.
44. Yang, J.; Hao, C.; Yang, D.; Shi, D.; Song, X.; Luan, X.; Hu, G.; Yan, B. Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes. *Toxicol. Lett.* **2010**, *197*, 219–226.
45. Tirona, R.G.; Lee, W.; Leake, B.F.; Lan, L.B.; Cline, C.B.; Lamba, V.; Parviz, F.; Duncan, S.A.; Inoue, Y.; Gonzalez, F.J. et al. The orphan nuclear receptor HNF4 α determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 220–224.
46. Wang, Y.M.; Ong, S.S.; Chai, S.C.; Chen, T. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2012**, *8*, 803–817.
47. Kosloski, M.P.; Wang, H.; Pugatch, D.; Mensa, F.J.; Gane, E.; Lawitz, E.; Marbury, T.C.; Preston, R.A.; Kort, J.; Liu, W. Pharmacokinetics and safety of glecaprevir and pibrentasvir in HCV-negative subjects with hepatic impairment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2019**, *75*, 217–226.
48. Mogalian, E.; Mathias, A.; Brainard, D.; McNally, J.; Moorehead, L.; Hernandez, M.; Robson, R.A.; Ries, D.K.; Lasseter, K.; Marbury, T. The pharmacokinetics of GS-5816, a pangenotype HCV NS5A inhibitor, in HCV-uninfected subject with moderate and severe hepatic impairment [abstract no. P742]. *J. Hepatol.* **2014**, *60* (Suppl. 1), S317.

49. Khatri, A.; Menon, R.; Marbury, T.C.; Lawitz, E.; Podsadecki, T.J.; Mullally, V.; Ding, B.; Awni, W.M.; Bernstein, B.M.; Dutta, S. Pharmacokinetics and safety of coadministered paritaprevir plus ritonavir (paritaprevir/r), ombitasvir, and dasabuvir in hepatic impairment. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 805–812.
50. Sekar, V.; Simion, A.; Peeters, M.; Spittaels, K.; Lawitz, E.; Marbury, T.C.; De Smedt, G. Pharmacokinetics of TMC435 in subjects with moderate hepatic impairment [abstract no. 472]. *J. Hepatol.* **2011**, *54* (Suppl. 1), S193.
51. Ouwerkerk-Mahadevan, S.; Simion, A.; Spittaels, K.; Beumont-Mauviel, M. Pharmacokinetics of simeprevir (TMC435) in volunteers with moderate or severe hepatic impairment [abstract no. 887]. *J. Hepatol.* **2013**, *58* (Suppl. 1), S229.
52. EMA. Olysio Product Information. 2014. Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002777/WC500167867.pdf (accessed on 29 September 2015).
53. Marshall, W.L.; Feng, H.P.; Wenning, L.; Garrett, G.; Huang, X.; Liu, F.; Panebianco, D.; Caro, L.; Fandozzi, C.; Lasseter, K.C. et al. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single-dose elbasvir in participants with hepatic impairment. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2018**, *43*, 321–329.
54. Jacobson, I.M.; Poordad, F.; Firpi-Morell, R.; Everson, G.T.; Verna, E.C.; Bhanja, S. Efficacy and safety of grazoprevir and elbasvir in hepatitis C genotype 1-infected patients with child–pugh class B cirrhosis (C-salt part A) [abstract no. O008]. *J. Hepatol.* **2015**, *62*(Suppl. 2), S193–194.
55. Wiśniewski, J.R.; Zougman, A.; Nagaraj, N.; Mann, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 359–362.
56. Wenzel, C.; Drozdziak, M.; Oswald, S. Mass spectrometry-based targeted proteomics method for the quantification of clinically relevant drug metabolizing enzymes in human specimens. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2021**, *1180*, 122891.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.